

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 564**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/564** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**A61P 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2006 E 06770605 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2013 EP 1889065**

54 Título: **Procedimientos para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades que tienen un componente autoinmune y/o inflamatorio**

30 Prioridad:

**18.05.2005 US 682575 P**

**09.12.2005 US 749336 P**

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

**15.11.2013**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (50.0%)**

**Lichtstrasse 35**

**4056 Basel, CH y**

**XOMA TECHNOLOGY LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**AUKERMAN, SHARON LEA;**

**JALLAL, BAHIJA y**

**LUQMAN, MOHAMMAD**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 429 564 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

Procedimientos para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades que tienen un componente autoinmune y/o inflamatorio

5

## CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere al campo de la medicina de diagnóstico y de pronóstico, más particularmente a procedimientos para determinar la eficacia de agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades que tienen un componente autoinmune y/o inflamatorio que está asociado a señalización de CD40 anómala.

10

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Muchos miembros de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) de ligandos y sus receptores correspondientes regulan el crecimiento de células normales induciendo apoptosis o potenciando la supervivencia y proliferación celular. Es este equilibrio entre señales apoptóticas y señales de supervivencia y proliferación el que mantiene la homeostasis celular normal. Hasta la fecha se han identificado al menos 26 receptores de la familia TNF y 18 ligandos de la familia TNF. Las formas biológicamente activas de tanto los receptores como los ligandos son trímeros de proteína autoensamblados. Se han identificado formas de transmembrana y solubles de tanto los receptores como los ligandos. Aunque los dominios intracelulares de los receptores no comparten homología de secuencias, sus dominios extracelulares comprenden repeticiones ricas en cisteína de 40 aminoácidos. Sus colas citoplásmicas señalizan interactuando con dos grupos principales de proteínas intracelulares: factores asociados a receptores de TNF (TRAF3) y proteínas que contienen dominio de la muerte (DD). La interacción entre al menos seis sitios de unión a TRAF y TRAF humanos sobre la cola citoplásmica de algunos de estos receptores inicia varias rutas de señalización, que incluyen AKT (la serina/treonina cinasa denominada proteína cinasa B o PKB), factor nuclear KB (NF- $\kappa$ B) y proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK). Véase, por ejemplo, la revisión de Younes y Kadin (2003) *J. Clin. Oncol.* 18:3526-3534.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

El miembro de receptores de la familia TNF CD40 es un antígeno de superficie celular de 50-55 kDa presente sobre la superficie de linfocitos B humanos tanto normales como neoplásicos, células dendríticas, monocitos, macrófagos, linfocitos T CD8<sup>+</sup>, células endoteliales y células monocíticas y epiteliales. El antígeno CD40 también se expresa sobre linfocitos T activados, plaquetas activadas, células de músculo liso vasculares inflamadas, eosinófilos, membranas sinoviales en artritis reumatoide, fibroblastos dérmicos y otros tipos no linfoides de células. Dependiendo del tipo de célula que exprese CD40, la ligación puede inducir adhesión intercelular, diferenciación, activación y proliferación. Por ejemplo, la unión de CD40 a su ligando relacionado, CD40L (también designado CD154), estimula la proliferación y diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas, producción de anticuerpos, cambio de isotipo y generación de linfocitos B de memoria. Durante la diferenciación de linfocitos B, CD40 se expresa en pre-linfocitos B, pero se pierde tras la diferenciación en células plasmáticas.

El ligando de CD40 (CD40L), también conocido como CD154, es una proteína transmembrana de 32-33 kDa que también existe en dos formas solubles biológicamente activas más pequeñas, 18 kDa y 31 kDa, respectivamente (Graf y col. (1995) *Eur. J. Immunol.* 25:1749-1754; Mazzei y col. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:7025-7028; Pietravalle y col. (1996) *J. Biol. Chem.* 271:5965-5967). CD40L se expresa en linfocitos T colaboradores CD4<sup>+</sup> activados, pero no en reposo (Lane y col. (1992) *Eur. J. Immunol.* 22:2573-2578; Spriggs y col. (1992) *J. Exp. Med.* 176:1543-1550; y Roy y col. (1993) *J. Immunol.* 151:1-14). Tanto CD40 como CD40L se han clonado y caracterizado (Stamenkovi y col. (1989) *EMBO J.* 8:1403-1410; Armitage y col. (1992) *Nature* 357:80-82; Lederman y col. (1992) *J. Exp. Med.* 175:1091-1101; y Hollenbaugh y col. (1992) *EMBO J.* 11:4313-4321). Véase también la patente de EE.UU. nº 5.945.513, que describe CD40L humano. Las células transfectadas con el gen CD40L y que expresan la proteína CD40L sobre su superficie pueden provocar la proliferación de linfocitos B, y junto con otras señales estimulantes, pueden inducir la producción de anticuerpos (Armitage y col. (1992) arriba; y la patente de EE.UU. nº 5.945.513). Pacientes con enfermedad autoinmunitaria tienen elevados niveles en suero de CD40L soluble (CD40Ls) que no se observan en sujetos sanos. La expresión en exceso de CD40L produce enfermedades autoinmunitarias similares a lupus eritematoso sistémico en modelos de roedor (Higuchi y col. (2002) *J. Immunol.* 168:9-12). A diferencia, la ausencia de CD40L funcional en linfocitos T activados produce síndrome de hiper-IgM ligado al X (Allen y col. (1993) *Science* 259:990; y Korthauer y col. (1993) *Nature* 361:539). Además, el bloqueo de la interacción CD40/CD40L puede prevenir el rechazo de trasplante en modelos de primate no humano. Véase, por ejemplo, Wee y col. (1992) *Transplantation* 53:501-7.

La expresión de CD40 en APC desempeña una función co-estimulante importante en la activación de estas células. Por ejemplo, se ha mostrado que anticuerpos monoclonales (mAb) anti-CD40 agonistas imitan los efectos de linfocitos T colaboradores en la activación de linfocitos B. Cuando se presentaron sobre células adherentes que expresan Fc $\gamma$ RII, estos anticuerpos inducen la proliferación de linfocitos B (Banchereau y col. (1989) *Science* 251:70). Además, los mAb anti-CD40 agonistas pueden sustituir la señal de linfocitos T colaboradores por la secreción de IgM, IgG e IgE en presencia de IL-4 (Gascan y col. (1991) *J. Immunol.* 147:8). Además, los mAb anti-CD40 agonistas pueden prevenir la muerte celular programada (apoptosis) de linfocitos B aislados de ganglios linfáticos.

Estas y otras observaciones sostienen la teoría actual de que la interacción de CD40 y CD40L desempeña una función esencial en la regulación de tanto respuestas inmunitarias humorales como mediadas por células. Estudios más recientes han revelado una función mucho más amplia de la interacción CD40/CD40L en diversos procesos fisiológicos y patológicos.

La ruta de transducción de señales de CD40 depende de la regulación coordinada de muchos factores intracelulares. Al igual que otros miembros de la familia de receptores de TNF, CD40 activa TRAF, que incluye TRAF-1, TRAF-2, -3, -5 y -6, que regulan por incremento diversas rutas de señalización tras la interacción de CD40 con CD40L (tanto CD40L unido a membrana como CD40L soluble), que incluyen cinasa regulada por señales extracelulares (ERK), cinasa del extremo amino de c-jun (JNK), p38 MAPK y NF- $\kappa$ B (véase, por ejemplo, Younes y Carbone (1999) *Int. J. Biol. Markers* 14:135-143; van Kooten y Banchereau (2000) *J. Leukoc. Biol.* 67:2-17).

Se ha mostrado que la señalización mediante CD40 previene la muerte celular de apoptosis (Makus y col. (2002) *J. Immunol.* 14:973-982). Las señales apoptóticas son necesarias para inducir muerte celular programada de un modo coordinado. Las señales de muerte celular pueden incluir estímulos intrínsecos de dentro de la célula tales como estrés del retículo endoplásmico o estímulos extrínsecos tales como unión a receptor de FasL o TNF $\alpha$ . La ruta de señalización es compleja, que implica activación de caspasas tales como caspasa-3 y caspasa-9, y de poli (ADP ribosa) polimerasa (PARP). Durante la cascada, las proteínas de señalización antiapoptótica, tales como Mcl-1 y Bcl-x, y miembros de la familia IAP de proteínas, tales como inhibidor ligado al X de apoptosis (XIAP), se regulan por disminución (Budihardjo y col. (1999) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15:269-290). Por ejemplo, en células dendríticas, la señalización de células por CD40 puede bloquear señales de apoptosis transducidas por FasL (Bjorck y col. (1997) *Intl. Immunol.* 9:365-372).

Así, la interacción de CD40 con CD40L y posterior activación de la señalización de CD40 son etapas necesarias para respuestas inmunitarias normales; sin embargo, la desregulación de la señalización de CD40 puede conducir a enfermedad. Se ha mostrado que la ruta de señalización de CD40 participa en enfermedad autoinmunitaria (Ichikawa y col. (2002) *J. Immunol.* 169:2781-2787 y Moore y col. (2002) *J. Autoimmun.* 19:139-145). Adicionalmente, la interacción CD40/CD40L desempeña una función importante en procesos inflamatorios. Por ejemplo, tanto CD40 como CD40L se expresan en exceso en lesiones de aterosclerosis humana y experimental. La estimulación de CD40 induce la expresión de enzimas que degradan la matriz y expresión de factor de tejido en tipos de células asociados a ateroma, tales como células endoteliales, células de músculo liso y macrófagos. Además, la estimulación de CD40 induce la producción de citocinas proinflamatorias tales como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), IL-1, IL-6 y IL-8, y moléculas de adhesión tales como ICAM-1, E-selectina y VCAM. La inhibición de la interacción CD40/CD40L previene la aterogénesis en modelos animales. En modelos de trasplante, el bloqueo de la interacción CD40/CD40L previene la inflamación. Se ha mostrado que la unión CD40/CD40L actúa sinérgicamente con el péptido beta-amiloide de Alzheimer para promover la activación de la microglía, conduciendo así a neurotoxicidad.

En pacientes con artritis reumatoide (AR), la expresión de CD40 es elevada en condrocitos articulares, así, la señalización de CD40 contribuye probablemente a la producción de citocinas dañinas y metaloproteinasas de matriz. Véase, Gotoh y col. (2004) *J. Rheumatol.* 31:1506-1512. Además, se ha mostrado que la amplificación de la respuesta inflamatoria sinovial se produce mediante la activación de MAPK y NF- $\kappa$ B mediante la ligación de CD40 sobre células sinoviales de CD14<sup>+</sup> de pacientes con AR (Harigai y col. (2004) *Arthritis. Rheum.* 50:2167-2177). En un modelo experimental de ARN, el tratamiento con anticuerpos dirigidos a CD40L previno la inducción de enfermedad, inflamación de articulaciones y producción de anticuerpos anti-colágeno (Durie y col. (1993) *Science* 261:1328-1330). Finalmente, en ensayos clínicos, se ha mostrado que la reducción de linfocitos B positivos CD20<sup>+</sup> de pacientes con AR administrando Rituxan® (generalmente indicado para linfoma de linfocitos B) mejora los síntomas (Shaw y col. (2003) *Ann. Rheum. Dis.* 62(Suppl. 2):ii55-ii59).

También se ha mostrado que el bloqueo de interacciones CD40/CD40L durante la presentación de antígeno a linfocitos T induce tolerancia a linfocitos T. Por tanto, el bloqueo de la interacción CD40/CD40L previene la inicial activación de linfocitos T, además de inducir la tolerancia a largo plazo a re-exposición al antígeno.

Dada la importante función de la señalización de CD40 mediada por CD40L en el mantenimiento de la inmunidad normal, se necesitan procedimientos para identificar individuos con una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria que serían sensibles a pautas de tratamiento que eligen como diana la señalización de CD40.

## RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona un procedimiento para identificar un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria que es sensible a tratamiento con un agente terapéutico anti-CD40, comprendiendo dicho procedimiento:

- a) proporcionar una muestra biológica de prueba y una muestra biológica de control obtenidas de dicho sujeto, en el que dicha muestra biológica de prueba y dicha muestra biológica de control comprenden células que expresan CD40 que han sido estimuladas con un ligando de CD40;

b) poner en contacto dicha muestra biológica de prueba con una cantidad eficaz de dicho agente terapéutico anti-CD40;

c) detectar el nivel de al menos un biomarcador en dicha muestra biológica de prueba, en el que dicho biomarcador está seleccionado del grupo que consiste en:

(i) un biomarcador de apoptosis celular, en el que dicho biomarcador de apoptosis está seleccionado del grupo que consiste en una proteína caspasa escindida, poli ADP-ribosa polimerasa (PARP) escindida, expresión en la superficie celular de fosfotidilserina (PS), fragmentación de ADN genómico, y cualquier combinación de las mismas;

(ii) un biomarcador de una ruta de señalización de CD40 mediada por CD40L, en el que dicha ruta de señalización de CD40 mediada por CD40L está seleccionada del grupo que consiste en la ruta de señalización de AKT, la ruta de señalización de NF- $\kappa$ B y una ruta de señalización de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), y dicho biomarcador de dicha ruta de señalización de CD40 mediada por CD40L está seleccionado del grupo que consiste en proteína fosfo-PI3K, fosfo-PDK1, fosfo-AKT, fosfo-MEK, fosfo-ERK, fosfo-p38, fosfo-IKK $\alpha/\beta$ , fosfo-I $\kappa$ B y NF- $\kappa$ B activada; y

(iii) un biomarcador de supervivencia celular, en el que dicho biomarcador de supervivencia celular está seleccionado del grupo que consiste en una proteína antiapoptósica que es un miembro de la familia Bcl-2, una proteína inhibidora de la apoptosis IAP y factor 1 asociado a receptor de TNF (TRAF-1); y

d) comparar el nivel de dicho al menos un biomarcador en dicha muestra biológica de prueba con el nivel de dicho al menos un biomarcador detectado en dicha muestra biológica de control, en el que dicha muestra biológica de control no se ha puesto en contacto con dicho agente terapéutico anti-CD40, en el que

(i) un aumento en el nivel de al menos uno de dichos biomarcadores de apoptosis; y/o

(ii) una reducción en el nivel de al menos uno de dichos biomarcadores de al menos una de dichas rutas de señalización de CD40 mediadas por CD40L; y/o

(iii) una reducción en el nivel de al menos uno de dichos biomarcadores de supervivencia celular;

en dicha muestra biológica de prueba con respecto a dicha muestra biológica de control es indicativo de un sujeto que se beneficiaría del tratamiento con dicho agente terapéutico anti-CD40,

y en el que dicho agente terapéutico anti-CD40 es un anticuerpo monoclonal anti-CD40 antagonista o fragmento de unión a antígeno del mismo que puede unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expresado sobre la superficie de un linfocito B humano, y que está libre de actividad antagonista significativa cuando se une al antígeno CD40 expresado sobre la superficie de dicho linfocito B.

#### BREVE RESUMEN

Se proporcionan procedimientos para identificar sujetos que tienen una enfermedad inflamatoria y/o enfermedad autoinmunitaria que se beneficiarán de agentes terapéuticos anti-CD40 que incluyen aquellos que modulan la señalización mediada por CD40L y/o modulan la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Tales agentes terapéuticos anti-CD40 incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-CD40 antagonistas, anticuerpos anti-CD40L antagonistas y agentes farmacológicos que bloquean o interfieren con la interacción CD40/CD40L, particularmente la señalización de CD40 mediada por CD40L, además de anticuerpos anti-CD40 antagonistas que tienen, adicionalmente o alternativamente, actividad de ADCC como modo de acción. En algunos ejemplos, los procedimientos comprenden el uso de biomarcadores de apoptosis celular, proliferación y supervivencia celular, y rutas de señalización de CD40 para monitorizar la respuesta celular *ex vivo* a uno o más agentes terapéuticos anti-CD40 de interés. Estos ensayos de pronóstico *ex vivo* comprenden proporcionar una muestra biológica de prueba y una muestra biológica de control de un sujeto candidato, comprendiendo estas muestras biológicas células que expresan CD40 que han sido estimuladas con un ligando de CD40, tanto *in vivo* como *ex vivo*; poner en contacto la muestra biológica de prueba con el agente terapéutico anti-CD40 de interés; detectar el nivel de expresión de al menos un biomarcador dentro de la muestra biológica de prueba; y comparar el nivel de expresión del (de los) biomarcador(es) con el nivel de expresión correspondiente detectado en la muestra biológica de control que no se ha puesto en contacto con el agente terapéutico anti-CD40 de interés. Biomarcadores para su uso en estos ensayos de pronóstico *ex vivo* incluyen proteínas y/o genes cuyos niveles de expresión son indicadores de pronóstico de sensibilidad a intervención del tratamiento, que incluyen biomarcadores de apoptosis celular, biomarcadores de rutas de señalización de CD40 mediadas por CD40L y biomarcadores de proliferación o supervivencia celular, que dependen del modo de acción del agente terapéutico anti-CD40. Si el agente terapéutico anti-CD40 tiene su modo de acción mediante la alteración de la señalización de CD40 mediada por CD40L, biomarcadores de apoptosis celular, rutas de señalización de CD40 mediadas por CD40L y proliferación o supervivencia celular pueden usarse en estos ensayos de pronóstico *ex vivo*. En algunos ejemplos pueden ensayarse marcadores de señalización de CD40 mediada por CD40L adicionales, que incluyen, pero no se limitan a, citocinas que están reguladas por incremento mediante la interacción CD40L-CD40, por ejemplo, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), interleucina (IL)-6, IL-8, IL-10, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1) y proteína inflamatoria de macrófagos 1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ). Si el agente terapéutico anti-CD40 tiene su modo de acción mediante ADCC, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40, en estos ensayos de

pronóstico *ex vivo* pueden usarse biomarcadores de apoptosis celular.

En otros ejemplos, sujetos candidatos se criban para el nivel de expresión de uno o más factores relacionados con CD40 que son predictivos de un individuo, o una subpoblación de individuos, que se beneficiarán de la intervención con agentes terapéuticos anti-CD40. Así, muestras biológicas recogidas de sujetos candidatos, por ejemplo, sujetos que tienen una enfermedad que comprende un componente autoinmune y/o inflamatorio, se criban para uno o más factores relacionados con CD40 seleccionados del grupo que consiste en nivel de expresión de antígeno CD40 de la superficie celular sobre células de una muestra biológica, nivel de expresión de CD40L de la superficie celular sobre células de una muestra biológica, nivel en circulación de CD40 soluble (CD40s) y nivel en circulación de CD40L soluble (CD40Ls). Estos factores relacionados con CD40 pueden ser indicadores de pronóstico de la enfermedad y pueden usarse adicionalmente para identificar sujetos que responderían o no a intervención terapéutica con agentes terapéuticos anti-CD40, independientemente del modo de acción del agente terapéutico anti-CD40. Un nivel de expresión elevado de uno o más de estos factores relacionados con CD40 dentro de una muestra biológica cuando se compara con un control o patrón de referencia sería indicativo de un individuo que se beneficiaría de la intervención terapéutica con un agente terapéutico anti-CD40 que modula la señalización de CD40 mediada por CD40L, modula ADCC, o ambos. Sujetos candidatos identificados con este procedimiento de cribado pueden tratarse con un agente terapéutico anti-CD40 de interés, o pueden cribarse adicionalmente para sensibilidad a agentes terapéuticos anti-CD40 usando los ensayos de pronóstico *ex vivo* descritos en el presente documento.

En todavía otros ejemplos, sujetos candidatos se criban para la presencia o ausencia de uno o más marcadores de pronóstico clínicamente útiles con el fin de definir subpoblaciones de sujetos candidatos que tienen un mal pronóstico con otras clases de terapéuticos, pero que se beneficiarán de la intervención con agentes terapéuticos anti-CD40. De este modo, muestras biológicas recogidas de sujetos candidatos se criban para uno o más marcadores de pronóstico clínicamente útiles conocidos por ser indicadores de mal pronóstico con los actuales terapéuticos cuyo modo de acción no es mediante la elección como diana de CD40 o señalización de CD40 mediada por CD40L. Cualquier marcador de pronóstico clínicamente útil para una enfermedad autoinmune o inflamatoria dada puede incluirse en el procedimiento de cribado. Los sujetos candidatos dentro de una subpoblación identificada con este procedimiento de cribado pueden cribarse adicionalmente para sensibilidad a agentes terapéuticos anti-CD40 usando los ensayos de pronóstico *ex vivo* descritos en el presente documento.

En el presente documento también se desvelan procedimientos para monitorizar la eficacia de un agente terapéutico anti-CD40 en el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria. De este modo, un sujeto que recibe una terapia con un agente terapéutico anti-CD40, que puede o no haber sido previamente cribado usando un ensayo de pronóstico *ex vivo* desvelado en el presente documento, se monitoriza para cambios *in vivo* en la expresión de al menos un biomarcador de apoptosis celular, proliferación y supervivencia celular, y/o una o más rutas de señalización de CD40 mediadas por CD40L tras el tratamiento con el agente terapéutico anti-CD40. Los biomarcadores particulares que van a ensayarse pueden elegirse basándose en el modo de acción del agente terapéutico como se observa anteriormente. Alternativamente, o adicionalmente, el sujeto puede monitorizarse para cambios *in vivo* en el nivel de expresión de uno o más factores relacionados con CD40 seleccionados del grupo que consiste en antígeno CD40 de la superficie celular sobre células, CD40L de la superficie celular sobre células, nivel en circulación de CD40s y nivel en circulación de CD40Ls tras el tratamiento con el agente terapéutico anti-CD40. De este modo, una primera muestra biológica se obtiene del sujeto y se ensaya para el nivel de expresión de uno o más de estos biomarcadores y/o factores relacionados con CD40 para obtener un nivel de referencia de expresión para cada factor ensayado, y luego se obtienen una o más muestras biológicas posteriores del sujeto y se ensayan para el (los) mismo(s) biomarcador(es) y/o factor(es) relacionado(s) con CD40, obteniéndose la posterior muestra biológica tras la administración de al menos una dosis del agente terapéutico anti-CD40 de interés. La monitorización puede producirse en un único momento en el tiempo, o en múltiples momentos en el tiempo, para determinar la eficacia de cualquier protocolo de tratamiento dado en el que el agente terapéutico anti-CD40 se administra al sujeto. Dependiendo del biomarcador que se ensaya, una disminución o aumento en el nivel de expresión del biomarcador entre cualesquiera dos momentos de tiempo puede ser indicativo de eficacia del agente terapéutico anti-CD40 en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria. Si la monitorización revela una disminución en el nivel de expresión de uno o más de los factores relacionados con CD40, un resultado tal puede ser indicativo de eficacia del agente terapéutico anti-CD40 en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria.

El nivel de expresión de estos diversos biomarcadores y factores relacionados con CD40, y cualquier marcador de pronóstico clínicamente útil en una muestra biológica, puede detectarse al nivel de proteína o ácido nucleico usando, por ejemplo, técnicas inmunohistoquímicas o técnicas basadas en ácidos nucleicos tales como hibridación *in situ* y RT-PCR. En algunas realizaciones, un nivel elevado o un aumento en la expresión de al menos un biomarcador es indicativo de una respuesta terapéutica positiva a tratamiento con un agente terapéutico anti-CD40. En otras realizaciones, un nivel reducido o una disminución en la expresión de al menos un biomarcador es indicativo de una respuesta terapéutica positiva a tratamiento con el agente terapéutico anti-CD40.

Los procedimientos desvelados en el presente documento pueden usarse para identificar sujetos para los que la intervención terapéutica anti-CD40 sería beneficiosa en prevenir, mejorar o tratar enfermedades que comprenden

un componente autoinmune y/o inflamatorio, que incluyen, pero no se limitan a, enfermedades autoinmunes e inflamatorias tales como lupus eritematoso sistémico (LES), lupus discoide, nefritis lúpica, sarcoidosis, artritis inflamatoria, que incluye, pero no se limita a, artritis juvenil, artritis reumatoide, artritis psoriásica, síndrome de Reiter, espondilitis anquilosante y artritis gotosa, rechazo de un trasplante de órgano o tejido, rechazo hiperagudo, agudo o crónico y/o enfermedad de injerto frente a huésped, esclerosis múltiple, síndrome de hiper IgE, poliarteritis nodosa, cirrosis biliar primaria, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca (enteropatía sensible al gluten), hepatitis autoinmune, anemia perniciosa, anemia hemolítica autoinmune, psoriasis, esclerodermia, miastenia grave, púrpura trombocitopénica autoinmune, tiroiditis autoinmune, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad por complejos inmunes, síndrome de fatiga crónica y disfunción inmune (SFCDI), polimiositis y dermatomiositis, crioglobulinemia, trombólisis, cardiomiopatía, pénfigo vulgar, fibrosis pulmonar intersticial, sarcoidosis, diabetes mellitus tipo I y tipo II, hipersensibilidad de tipo retardado tipo 1, 2, 3 y 4, alergia o trastornos alérgicos, respuestas inmunitarias no deseadas/no intencionadas a proteínas terapéuticas, asma, síndrome de Churg-Strauss (granulomatosis alérgica), dermatitis atópica, dermatitis de contacto alérgica e irritante, urticaria, alergia mediada por IgE, aterosclerosis, vasculitis, miopatías inflamatorias idiopáticas, enfermedad hemolítica, enfermedad de Alzheimer, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, y similares.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra que la señalización y supervivencia de linfocitos B humanos normales se inducen por CD40L y se bloquean por CHIR-12.12.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente divulgación se refiere a procedimientos para identificar sujetos que tienen una enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria que se beneficiarían del tratamiento con agentes terapéuticos anti-CD40 que eligen como diana el receptor de CD40 y que modulan ADCC, interfieren con la señalización de CD40, particularmente las rutas de señalización de CD40 que están mediadas por interacción de CD40 con el ligando de CD40 (CD40L), o ambos. En un ejemplo, los procedimientos comprenden el uso de ensayos de pronóstico *ex vivo* para monitorizar los efectos de agentes terapéuticos anti-CD40 antagonistas que bloquean o interfieren con la señalización de CD40 mediada por CD40L en el nivel de expresión de tres clases de biomarcadores que están asociados a señalización de CD40 mediada por CD40L, particularmente biomarcadores de proliferación o supervivencia celular y rutas apoptóticas celulares y biomarcadores de rutas de señalización de CD40 mediadas por CD40L clave, que incluyen las rutas de señalización de proteínas cinasas AKT, NF- $\kappa$ B y activadas por mitógeno (MAPK). Marcadores adicionales que pueden servir para monitorizar los efectos de agentes terapéuticos anti-CD40s antagonistas que bloquean o interfieren con la señalización de CD40 mediada por CD40L incluyen citocinas que están reguladas por incremento mediante la señalización de CD40 mediada por CD40L, como se observa en el presente documento más adelante. Biomarcadores para rutas apoptóticas celulares también pueden servir para monitorizar efectos de agentes terapéuticos anti-CD40 que modulan ADCC, por ejemplo, anticuerpos anti-CD40 que tienen ADCC como modo de acción. Agentes terapéuticos que actúan de antagonistas de señalización de CD40, denominados en el presente documento "antagonistas de CD40", pueden interferir con una o más de las pistas de señalización normalmente provocadas uniendo CD40L al receptor de CD40. Los ensayos de pronóstico *ex vivo* pueden usarse para discriminar entre sujetos que se beneficiarían de la intervención con antagonistas de CD40 y agentes terapéuticos que eligen como diana CD40 y modulan ADCC, y aquellos para los que la intervención con estos tipos de agentes terapéuticos no sería beneficiosa. Sujetos candidatos pueden cribarse adicionalmente, o alternativamente, para la presencia o ausencia de, o niveles elevados o disminuidos de, uno o más factores relacionados con CD40 y/o uno o más marcadores de pronóstico clínicamente útiles para definir individuos o subpoblaciones de sujetos candidatos que se beneficiarían de la intervención terapéutica con agentes terapéuticos anti-CD40 que modulan la señalización de CD40 mediada por CD40L y/o ADCC. Sujetos identificados en estos procedimientos de cribado pueden cribarse adicionalmente usando los ensayos de pronóstico *ex vivo* descritos en el presente documento. Los biomarcadores y factores relacionados con CD40 descritos en el presente documento también se usan en la monitorización de la eficacia del tratamiento con agentes terapéuticos anti-CD40 que modulan la señalización de CD40 y/o ADCC, y en determinar la base para la sensibilidad a fármacos en pacientes individuales o subpoblaciones de pacientes que tienen una enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria.

Por "antígeno CD40", "antígeno de la superficie celular CD40", "receptor de CD40" o "CD40" está prevista una glucoproteína transmembrana que pertenece a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n<sup>o</sup> 5.674.492 y 4.708.871; Stamenkovic y col. (1989) EMBO 8:1403; Clark (1990) Tissue Antigens 36:33; Barclay y col. (1997) The Leucocyte Antigen Facts Book (2<sup>a</sup> ed.; Academic Press, San Diego)). Se han identificado dos isoformas de CD40 humana, codificadas por variantes de transcrito alternativamente cortadas y empalmadas de este gen. La primera isoforma (también conocida como "isoformas largas" o "isoforma 1") se expresa como un polipéptido precursor de 277 aminoácidos (SEC ID N<sup>o</sup>: 12 (informada por primera vez como acceso de GenBank n<sup>o</sup> CAA43045, e identificada como isoforma 1 en acceso de GenBank n<sup>o</sup> NP\_001241), codificada por SEC ID N<sup>o</sup>: 11 (véanse acceso de GenBank n<sup>o</sup> X60592 y NM\_001250)), que tiene una secuencia señal representada por los 19 primeros residuos. La segunda isoforma (también conocida como "isoformas cortas" o "isoforma 2") se expresan como un polipéptido precursor de 203 aminoácidos (SEC ID N<sup>o</sup>: 10 (acceso de GenBank n<sup>o</sup> NP\_690593), codificado por SEC ID N<sup>o</sup>: 9 (acceso de GenBank n<sup>o</sup> NM\_152854)), que

también tiene una secuencia señal representada por los 19 primeros residuos. Los polipéptidos precursores de estas dos isoformas de CD40 humana comparten en común sus 165 primeros residuos (es decir, residuos 1-165 de SEC ID N°: 10 y SEC ID N°: 12). El polipéptido precursor de la isoforma corta (mostrado en SEC ID N°: 10) está codificada por una variante de transcrito (SEC ID N°: 9) que carece de un segmento codificante, que conduce a un desplazamiento del marco de traducción; la isoforma de CD40 resultante contiene un extremo C más corto y distinto (residuos 166-203 de SEC ID N°: 10) de los contenidos en la isoforma larga de CD40 (extremo C mostrado en los residuos 166-277 de SEC ID N°: 12). Para los fines de la presente invención, el término "antígeno CD40", "antígeno de la superficie celular CD40", "receptor de CD40" o "CD40" engloba tanto las isoformas cortas como largas de CD40.

El antígeno CD40 se muestra sobre la superficie de una variedad de tipos de células, como se describe en cualquier parte en el presente documento. Por "presentado sobre la superficie" y "expresado sobre la superficie" está previsto que toda o una parte del antígeno CD40 se exponga al exterior de la célula. El antígeno CD40 presentado o expresado puede estar completamente o parcialmente glucosilado.

Por "actividad agonista" está previsto que la sustancia funcione de agonista. Un agonista se combina con un receptor sobre una célula e inicia una reacción o actividad que es similar a o la misma que la iniciada por el ligando natural del receptor. Por ejemplo, un agonista de CD40 induce cualquiera, o todas de, pero no se limitan a, las siguientes respuestas: proliferación y/o diferenciación celular; regulación por incremento de adhesión intercelular mediante moléculas tales como ICAM-1, E-selectina, VCAM y similares; secreción de citocinas pro-inflamatorias tales como VEGF, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF y similares; transducción de señales mediante el receptor de CD40 por rutas tales como TRAF (por ejemplo, TRAF-1, TRAF2, TRAF3), cinasas MAP tales como NIK (cinasa inductora de NF- $\kappa$ B), cinasas I-kappa B (IKK  $\alpha/\beta$ ), factor de transcripción NF- $\kappa$ B, Ras y la ruta de MEK/ERK, la ruta de PI3K/AKT, la ruta de P38 MAPK, y similares; transducción de una señal antiapoptósica por moléculas tales como XIAP, Mcl-1, Bcl-x y similares; generación de linfocitos B y/o T de memoria; producción de anticuerpos para linfocitos B; cambio de isotipo de linfocitos B, regulación por incremento de la expresión en la superficie celular de MHC de clase II y CD80/86, y similares.

Por "actividad antagonista" está previsto que la sustancia funcione de antagonista. Por ejemplo, un antagonista de CD40 previene o reduce la inducción de cualquiera de las respuestas inducidas uniendo el receptor de CD40 con un ligando de agonista, particularmente CD40L. El antagonista puede reducir la inducción de una cualquiera o más de las respuestas al agonista uniéndose el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, preferentemente el 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, más preferentemente el 70%, 80%, 85%, y lo más preferentemente el 90%, 95%, 99% o el 100%. Procedimientos para medir la especificidad de unión del ligando de CD40 y la actividad antagonista de un agente terapéutico anti-CD40, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40, son conocidos para un experto en la materia e incluyen, pero no se limitan a, ensayos de unión competitiva convencionales, ensayos para monitorizar la secreción de inmunoglobulinas por linfocitos B, ensayos de proliferación de linfocitos B, ensayos de proliferación de linfocitos B similares a Banchereau, ensayos de linfocitos T colaboradores para la producción de anticuerpos, co-estimulación de ensayos de proliferación de linfocitos B y ensayos para la regulación por incremento de marcadores de activación de linfocitos B. Véanse, por ejemplo, tales ensayos desvelados en el documento WO 00/75348 y la patente de EE.UU. n° 6.087.329. Véase también la solicitud de patente internacional n° PCT/US2004/037152 (expediente de agente n° PP20107.004 (035784/282916)), también titulada "*Anticuerpos monoclonales anti-CD40 antagonistas y procedimientos para su uso*", presentada el 4 de noviembre de 2004 y publicada como WO 2005/044854.

Por actividad agonista "significativa" está prevista una actividad agonista de al menos el 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o el 100% superior a la actividad agonista inducida por una sustancia neutra o control negativo como se mide en un ensayo de una respuesta de linfocitos B. Preferentemente, actividad agonista "significativa" es una actividad agonista que es al menos 2 veces mayor o al menos 3 veces mayor que la actividad agonista inducida por una sustancia neutra o control negativo como se mide en un ensayo de una respuesta de linfocitos B. Así, por ejemplo, si la respuesta de linfocitos B de interés es la proliferación de linfocitos B, actividad agonista "significativa" sería la inducción de un nivel de proliferación de linfocitos B que es al menos 2 veces mayor o al menos 3 veces mayor que el nivel de proliferación de linfocitos B inducido por una sustancia neutra o control negativo. En un ejemplo, una inmunoglobulina no específica, por ejemplo IgG1, que no se une a CD40 sirve de control negativo. Una sustancia "libre de actividad antagonista significativa" presentaría una actividad agonista no más de aproximadamente el 25% superior a la actividad agonista inducida por una sustancia neutra o control negativo, preferentemente no más de aproximadamente el 20% superior, 15% superior, 10% superior, 5% superior, 1% superior, 0,5% superior, o incluso no más de aproximadamente el 0,1% superior que la actividad agonista inducida por una sustancia neutra o control negativo como se mide en un bioensayo tal como un ensayo de respuesta a linfocitos B.

En algunas realizaciones de la invención, el agente terapéutico anti-CD40 es un anticuerpo anti-CD40 antagonista. Tales anticuerpos están libres de actividad antagonista significativa como se observa anteriormente cuando se unen a un antígeno CD40 sobre una célula humana. En una realización de la invención, el anticuerpo anti-CD40 antagonista está libre de actividad antagonista significativa en una respuesta celular. En otra realización de la invención, el anticuerpo anti-CD40 antagonista está libre de actividad antagonista significativa en ensayos de más de una respuesta celular (por ejemplo, proliferación y diferenciación, o proliferación, diferenciación y, para

linfocitos B, producción de anticuerpos). En algunos ejemplos de la invención, el agente terapéutico anti-CD40 de interés es el anticuerpo monoclonal completamente humano CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o fragmento de unión a antígeno del mismo, como se observa en el presente documento más adelante.

5 Cualquiera de los ensayos conocidos en la técnica puede usarse para determinar si un agente terapéutico anti-CD40 actúa o no de antagonista de una o más respuestas de linfocitos B. En algunos ejemplos, el agente terapéutico es un anticuerpo anti-CD40 que actúa de antagonista de al menos una respuesta de linfocitos B seleccionada del grupo que consiste en proliferación de linfocitos B, diferenciación de linfocitos B, producción de anticuerpos, adhesión intercelular, generación de linfocitos B de memoria, cambio de isotipo, regulación por  
10 incremento de la expresión en la superficie celular de MHC de clase II y CD80/86, y secreción de citocinas pro-inflamatorias tales como VEGF, IL-8, IL-12 y TNF. De particular interés son anticuerpos anti-CD40 antagonistas que están libres de actividad antagonista significativa con respecto a la proliferación de linfocitos B cuando se unen al antígeno CD40 humano sobre la superficie de un linfocito B humano.

15 En un ejemplo tal, el anticuerpo anti-CD40 es un antagonista de la proliferación de linfocitos B como se mide en un ensayo de proliferación de linfocitos B tal como el descrito en el Ejemplo 4 en el presente documento más adelante, y el anticuerpo anti-CD40 antagonista estimula la proliferación de linfocitos B a un nivel que no es más de aproximadamente el 25% superior a la proliferación de linfocitos B inducida por una sustancia neutra o control negativo, preferentemente no más de aproximadamente el 20% superior, 15% superior, 10% superior, 5% superior,  
20 1% superior, 0,5% superior, o incluso no más de aproximadamente el 0,1% superior a la proliferación de linfocitos B inducida por una sustancia neutra o control negativo.

En otro ejemplo, el anticuerpo anti-CD40 es un antagonista de proliferación de linfocitos B que se induce por otro anticuerpo anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo anti-CD40 S2C6, como se mide en un ensayo de proliferación  
25 de linfocitos B tal como el descrito en el Ejemplo 4 en el presente documento más adelante, y el nivel de proliferación de linfocitos B estimulado por el otro anticuerpo anti-CD40 en presencia del anticuerpo anti-CD40 antagonista no es superior a aproximadamente el 25% de la proliferación de linfocitos B inducida por el otro anticuerpo anti-CD40 en ausencia del anticuerpo anti-CD40 antagonista (es decir, al menos el 75% de inhibición), preferentemente no superior a aproximadamente el 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,5%, o incluso no superior a aproximadamente el 0,1% de la proliferación de linfocitos B inducida por el otro anticuerpo anti-CD40 en ausencia del anticuerpo anti-CD40 antagonista.  
30

En todavía otro ejemplo, el anticuerpo anti-CD40 es un antagonista de proliferación de linfocitos B que se induce por la línea celular EL4B5 como se mide en el ensayo de activación de linfocitos B descrito en el Ejemplo 4  
35 en el presente documento más adelante, y el nivel de proliferación de linfocitos B estimulado por la línea celular EL4B5 en presencia del anticuerpo anti-CD40 antagonista no es superior a aproximadamente el 25% de la proliferación de linfocitos B inducida por esta línea celular en ausencia del anticuerpo anti-CD40 antagonista (es decir, al menos el 75% de inhibición), preferentemente no superior a aproximadamente el 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,5%, o incluso no superior a aproximadamente el 0,1% de la proliferación de linfocitos B inducida por esta línea celular en ausencia del anticuerpo anti-CD40 antagonista.  
40

En todavía otros ejemplos, el anticuerpo anti-CD40 es un antagonista de la producción de anticuerpos inducida por linfocitos T humanos por linfocitos B humanos como se mide en el ensayo de linfocitos T colaboradores humanos para la producción de anticuerpos por linfocitos B descrito en el Ejemplo 4 en el presente documento más  
45 adelante. De este modo, el nivel de producción de anticuerpos IgG, producción de anticuerpos IgM, o tanto la producción de anticuerpos IgG como IgM por linfocitos B estimulados por linfocitos T en presencia del anticuerpo anti-CD40 antagonista, no es superior a aproximadamente el 50% de la producción de anticuerpos respectiva por linfocitos B estimulados por linfocitos T en ausencia del anticuerpo anti-CD40 antagonista (es decir, al menos el 75% de inhibición), preferentemente no superior a aproximadamente el 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,5%, o incluso no superior a aproximadamente el 0,1% de la producción de anticuerpos respectiva por linfocitos B estimulados por linfocitos T en ausencia del anticuerpo anti-CD40 antagonista.  
50

Por "ligando de CD40" está previsto cualquier péptido, polipéptido o proteína que pueda unirse a y activar una o más rutas de señalización de CD40. Así, "ligandos de CD40" incluyen, pero no se limitan a, proteínas ligando de  
55 CD40 de longitud completa y variantes y fragmentos de las mismas que retienen suficiente actividad para llevar a cabo la función de unión a y señalización de la estimulación de CD40 sobre células que expresan CD40. Modificaciones a un ligando de CD40 nativo, por ejemplo, ligando de CD40 humano (CD40L; también conocido como CD154) incluyen, pero no se limitan a, sustituciones, deleciones, truncaciones, extensiones, proteínas de fusión, fragmentos, peptidomiméticos y similares. En algunas realizaciones de la invención, los ensayos de pronóstico *ex vivo* incluyen el uso de CD40L soluble, por ejemplo, CD40L humano recombinante soluble (Alexis Corporation, Bingham, Nottinghamshire, RU) para estimular la señalización de CD40 sobre células que expresan CD40 de una muestra biológica.  
60

Por "señalización de CD40 mediada por CD40L" está previsto cualquiera de las actividades biológicas que resultan de la interacción de CD40 del receptor de la superficie celular con un ligando de CD40. Ejemplos de señalización de CD40 son señales que conducen a proliferación y supervivencia de células que expresan CD40, y  
65

estimulación de una o más rutas de señalización de CD40 dentro de células que expresan CD40. Una "ruta de señalización" de CD40 o "ruta de transducción de señales" pretende significar al menos una reacción bioquímica, o un grupo de reacciones bioquímicas, que resultan de la interacción del receptor de CD40 con un ligando de CD40, por ejemplo, CD40L, y que genera una señal que, cuando se transmite por la ruta de señalización, conduce a activación de una o más moléculas aguas abajo en la cascada de señalización. Las rutas de transducción de señales implican varias moléculas de transducción de señales que conducen a transmisión de una señal del receptor de CD40 de la superficie celular a través de la membrana plasmática de una célula, y mediante una o más en una serie de moléculas de transducción de señales, mediante el citoplasma de la célula, y en algunos casos, en el núcleo de la célula. De particular interés para la presente invención son rutas de transducción de señales de CD40, que incluyen la ruta de señalización de AKT, que conduce a la activación de AKT y, por último lugar, la activación de NF-KB mediante la ruta de señalización de NF-κB; y rutas de señalización de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), que incluyen la ruta de señalización de MEK/ERK y la ruta de señalización de MEK/p38, que conducen a la activación de ERK y p38, respectivamente. El equilibrio entre activación y bloqueo de estas rutas de señalización favorece tanto la supervivencia como la apoptosis celular como se observa en el presente documento más adelante.

Los procedimientos de la presente invención se refieren a ensayos de pronóstico *ex vivo*, y ensayos de pronóstico que utilizan anticuerpos, tanto en una etapa de detección, o bien como agentes terapéuticos anti-CD40 candidatos que están siendo probados en estos ensayos de pronóstico *ex vivo*. Los siguientes términos y definiciones se aplican a tales anticuerpos.

"Anticuerpos" e "inmunoglobulinas" (Ig) son glucoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Los términos se usan sinónimamente. En algunos casos, la especificidad por antígenos de la inmunoglobulina puede ser conocida.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y engloba anticuerpos completamente ensamblados, fragmentos de anticuerpos que pueden unirse a antígeno (por ejemplo, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, anticuerpos monocatenarios, diacuerpos, quimeras de anticuerpos, anticuerpos híbridos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos humanizados y similares) y péptidos recombinantes que comprenden los anteriores.

Los términos "anticuerpo monoclonal" y "mAb" como se usan en el presente documento se refieren a un anticuerpo obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores.

"Anticuerpos nativos" e "inmunoglobulinas nativas" son normalmente glucoproteínas heterotetrámeras de aproximadamente 150.000 dalton compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está ligada a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro entre cadenas regularmente separadas. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V<sub>H</sub>) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V<sub>L</sub>) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una superficie de separación entre los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables se diferencian ampliamente en secuencia entre anticuerpos. Regiones variables confieren especificidad de unión a antígeno. Sin embargo, la variabilidad no está uniformemente distribuida a través de los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables, tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se llaman regiones estructurales (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro FR regiones, que adoptan ampliamente una configuración de hojas plegadas β, conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos que forman parte de, la estructura de hojas plegadas β. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de anticuerpos (véase Kabat y col. (1991) NIH Publ. n° 91-3 242, vol. I, páginas 647-669). Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como unión a receptor de Fc, participación del anticuerpo en toxicidad celular dependiente de anticuerpo, iniciación de la citotoxicidad dependiente del complemento y desgranulación de mastocitos.

El término "región hipervariable", cuando se usa en el presente documento, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (es decir, residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat y col. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable"

(es decir, residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Clothia y Lesk, (1987) J. Mol. Biol., 196:901-917). Residuos de la "región estructural" o de "FR" son aquellos residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable, como se ha considerado en el presente documento.

5 Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab, F(ab')<sub>2</sub> y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (Zapata y col. (1995) Protein Eng. 10:1057-1062); moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. La  
10 digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. En tratamiento con pepsina da un fragmento de F(ab')<sub>2</sub> que tiene dos sitios de combinación de antígeno y todavía puede reticular antígeno.

15 "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y de unión de antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y ligera en asociación estrecha no covalente. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno sobre la superficie del dímero V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>. Conjuntamente, las seis CDR confieren especificidad de unión del antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un  
20 Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad para reconocer y unirse a antígeno, aunque a una menor afinidad que el sitio de unión entero.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (C<sub>H1</sub>) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab se diferencian de fragmentos Fab' mediante la adición de algunos  
25 residuos en el extremo carboxi del dominio C<sub>H1</sub> de la cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en los que el (los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes poseen un grupo tiol libre. Se producen fragmentos Fab' reduciendo el puente disulfuro de la cadena pesada del fragmento F(ab')<sub>2</sub>. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

30 Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie vertebrada pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), basadas en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

35 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas humanas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de las cadenas pesadas que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman alfa, delta, epsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras  
40 de subunidad y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas. Diferentes isotipos tienen diferentes funciones efectoras. Por ejemplo, los isotipos IgG1 y IgG3 humanos tienen actividad ADCC (citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos).

45 La palabra "marca" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición detectable que está conjugado directamente o indirectamente con el anticuerpo de manera que se genere un anticuerpo "marcado". La marca puede ser detectable por sí misma (por ejemplo, marcas de radioisótopo o marcas fluorescentes) o, en el caso de una marca enzimática, pueden catalizar la alteración química de un compuesto de sustrato o composición que es detectable.

50 Una "célula huésped", como se usa en el presente documento, se refiere a un microorganismo o una célula eucariota o línea celular cultivada como entidad unicelular que puede usarse, o que se ha usado, como receptor para un vector recombinante u otros polinucleótidos de transferencia, e incluyen la progenie de la célula original que se ha transfectado. Se entiende que una progenie de una única célula puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en complemento de ADN genómico o total a la parental original, debido a mutación natural,  
55 accidental o deliberada.

"Células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos Fc $\gamma$ RIII y llevan a cabo la función efectora de la citotoxicidad mediada por células dependientes de antígenos (ADCC). Ejemplos de leucocitos humanos que median en ADCC  
60 incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP), linfocitos citolíticos espontáneos (NK), monocitos, macrófagos, eosinófilos y neutrófilos, prefiriéndose CMSP y linfocitos NK. Los anticuerpos que tienen actividad de ADCC son normalmente del isotipo IgG1 o IgG3. Obsérvese que, además de aislar anticuerpos IgG1 e IgG3, tales anticuerpos que median en ADCC pueden prepararse manipulando una región variable de un anticuerpo no ADCC o fragmento de la región variable para una región constante de isotipo IgG1 o IgG3.

65 Los términos "receptor de Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un

anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII, que incluyen variantes alélicas y formas alternativamente cortadas y empalmadas de estos receptores. Los receptores Fc $\gamma$ RII incluyen Fc $\gamma$ RIIA (un "receptor activante") y Fc $\gamma$ RIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que se diferencian principalmente en los dominios citoplásmicos de las mismas. El receptor activante Fc $\gamma$ RIIA contiene un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor Fc $\gamma$ RIIB contiene un motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (véase Daeron (1997) Annu. Rev. Immunol. 15:203-234). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet (1991) Annu. Rev. Immunol. 9:457-492; Capel y col. (1994) Immunomethods 4:25-34; y de Haas y col. (1995) J. Lab. Clin. Med. 126:330-341. Otros FcR, que incluyen aquellos que van a identificarse en el futuro, están englobados por el término "FcR" en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer y col. (1976) J. Immunol. 117:587 y Kim y col. (1994) J. Immunol. 24:249).

Hay varias formas para preparar anticuerpos humanos. Por ejemplo, células secretantes pueden inmortalizarse por infección con el virus de Epstein-Barr (EBV). Sin embargo, las células infectadas por EBV son difíciles de clonar y normalmente solo producen rendimientos relativamente bajos de inmunoglobulina (James y Bell (1987) J. Immunol. Methods 100:5-40). En el futuro, la inmortalización de linfocitos B humanos podría lograrse posiblemente introduciendo una combinación definida de genes transformantes. Una posibilidad tal se resalta por una reciente demostración de que la expresión de la subunidad catalítica de telomerasa junto con la oncoproteína grande de SV40 y un alelo oncogénico de H-ras produjo la conversión tumorigénica de células epiteliales y de fibroblasto humanas normales (Hahn y col. (1999) Nature 400:464-468). Ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces de producir, tras la inmunización, un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulinas endógenas (Jakobovits y col. (1993) Nature 362:255-258; Lonberg y Huszar (1995) Int. Rev. Immunol. 13:65-93; Fishwild y col. (1996) Nat. Biotechnol. 14:845-851; Mendez y col. (1997) Nat. Genet. 15:146-156; Green (1999) J. Immunol. Methods 231:11-23; Tomizuka y col. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727; revisado en Little y col. (2000) Immunol. Today 21:364-370). Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión a la cadena pesada del anticuerpo (J $_H$ ) en ratones quiméricos y mutantes de la línea germinal produce la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos (Jakobovits y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-2555). La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulinas de la línea germinal humana en tales ratones mutantes de la línea germinal produce la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno (Jakobovits y col. (1993) Nature 362:255-258). Mendez y col. (1997) (Nature Genetics 15:146-156) han generado una línea de ratones transgénicos que, cuando se exponen a un antígeno, generan anticuerpos completamente humanos de alta afinidad. Esto se logró por integración de la línea germinal de loci de la cadena pesada y la cadena ligera humanos de megabases en ratones con delección en el segmento J $_H$  endógeno como se ha descrito anteriormente. Estos ratones (tecnología XenoMouse<sup>®</sup> II (Abgenix; Fremont, California)) alojan 1.020 kb de locus de la cadena pesada humana que contienen aproximadamente 66 genes V $_H$ , regiones D $_H$  y J $_H$  completas y tres regiones constantes diferentes, y también aloja 800 kb de locus  $\kappa$  humano que contienen 32 genes V $\kappa$ , segmentos J $\kappa$  y genes C $\kappa$ . Los anticuerpos producidos en estos ratones se parecen mucho a los observados en seres humanos en todos los aspectos, que incluyen transposición, ensamblaje y repertorio de genes. Los anticuerpos humanos se expresan preferencialmente sobre anticuerpos endógenos debido a la delección en segmento endógeno que previene la transposición génica en el locus murino. Tales ratones pueden inmunizarse con un antígeno de particular interés.

Los sueros de tales animales inmunizados pueden cribarse para la reactividad de anticuerpos contra el antígeno inicial. Pueden aislarse linfocitos de ganglios linfáticos o células del bazo y pueden seleccionarse adicionalmente para linfocitos B seleccionando células CD138 negativas y CD19 positivas. En un aspecto, tales cultivos de linfocitos B (BCC) pueden fusionarse con células de mieloma para generar hibridomas como se ha detallado anteriormente.

En otro aspecto, tales cultivos de linfocitos B pueden cribarse adicionalmente para, preferentemente, reactividad contra el antígeno inicial. Tal cribado incluye enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) con la proteína diana/antígeno, un ensayo de competencia con anticuerpos conocidos que se unen al antígeno de interés y unión *in vitro* a células CHO transitoriamente transfectadas u otras células que expresan el antígeno diana.

Biomarcadores, marcadores de citocinas, factores relacionados con CD40 y marcadores de pronóstico clínicamente útiles para su uso en los ensayos de pronóstico de la invención

En algunas realizaciones, los procedimientos de la presente invención comprenden el uso de ensayos de pronóstico *ex vivo* para monitorizar cambios en el nivel de expresión de uno o más biomarcadores de supervivencia celular, proliferación, apoptosis y rutas de señalización de CD40. Los ensayos de pronóstico *ex vivo* pueden usarse solos, o en combinación con otros ensayos de pronóstico, por ejemplo, ensayos de pronóstico que identifican sujetos candidatos que tienen una enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria que sería sensible a tratamiento con agentes terapéuticos anti-CD40 basándose en la expresión de otros factores relacionados con CD40 y/o basándose en la presencia o ausencia de, o expresión elevada o disminuida de, otros marcadores de pronóstico

clínicamente útiles que son indicativos de escaso pronóstico con intervención del tratamiento con agentes terapéuticos convencionales que tienen un modo de acción diferente del ejercido por agentes terapéuticos anti-CD40. Por "sensible al tratamiento con un agente terapéutico anti-CD40" está previsto que el sujeto candidato (es decir, un individuo con una enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria como se observa en el presente documento más adelante), cuando se trata con el agente terapéutico anti-CD40, tenga una respuesta terapéutica positiva con respecto a la enfermedad autoinmunitaria y/o enfermedad inflamatoria para la que se busca tratamiento.

*Biomarcadores para su uso en ensayos de pronóstico ex vivo.*

Las rutas de señalización se caracterizan por familias de proteína que facilitan la transducción de señales. El término "familia" cuando se refiere a moléculas de proteínas y de ácidos nucleicos pretende significar dos o más moléculas de proteínas o de ácidos nucleicos que tienen un dominio o motivo estructural común y que tienen suficiente homología de secuencias de aminoácidos o nucleótidos como se define en el presente documento. Tales miembros de las familias pueden producirse naturalmente o no naturalmente, y pueden ser de tanto la misma especie como de especies diferentes. Por ejemplo, una familia puede contener una primera proteína de origen humano, además de otras proteínas distintas de origen humano o, alternativamente, puede contener homólogos de origen no humano. Los miembros de una familia pueden también tener características funcionales comunes.

La familia AKT (algunas veces denominadas PKB, de proteína cinasa B) de serina/treonina cinasas participa íntegramente en el crecimiento, supervivencia y metabolismo celular. La PKB se identificó originariamente como un oncogén retrovírico. Actualmente se han caracterizado tres variantes de la familia AKT, la AKT-1 de 480 residuos, la AKT-2 de 481 residuos y la AKT-3 de 479 residuos. Para los fines de la presente invención, miembros de la familia AKT de proteínas se denominarán generalmente proteínas AKT, aunque se reconoce que los procedimientos se aplican a las tres formas de AKT, es decir, AKT-1, AKT-2 y AKT-3, y variantes de las mismas.

AKT es una serina/treonina cinasa regulada por factor de crecimiento que contiene un dominio de PH (homología de pleckstrina). Este dominio de PH interacciona con productos de lípido de fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), fosfatidilinositol-3,4-bisfosfato y fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, que producen la translocalización de AKT de un citosol de la célula a su membrana plasmática. Esta translocalización se requiere con el fin de presentar la AKT a una cinasa de activación aguas arriba, PDK1 (cinasa 1 dependiente de fosfoinositida). Una variedad de factores de supervivencia y de crecimiento tales como PDGF, EGF, insulina, trombina y NGF son conocidos por activar la translocalización de AKT. La forma activada (es decir, fosforilada) de la proteína AKT/PKB fosforila numerosos sustratos, que incluyen GSK-3 (glucógeno sintasa cinasa 3), eNOS (óxido nítrico sintasa endotelial), FKHR 1 (miembro 1 de la familia de factores de transcripción forkhead), Bad (miembro de la familia pro-apoptósica Bcl-2) y p21 CIP (inhibidor de la progresión del ciclo celular). Estas acciones pueden producir diversos efectos biológicos tales como supresión de la apoptosis, control del metabolismo de la glucosa, proliferación celular, transcripción, traducción, migración de células y angiogénesis. La AKT activada (es decir, p-AKT) promueve la supervivencia celular mediante varias rutas distintas que implican la fosforilación de moléculas efectoras aguas abajo. Primero, p-AKT inhibe la apoptosis fosforilando el componente Bad del complejo Bad/Bcl-xl. Bad fosforilado se une a 14-3-3 causando la disociación del complejo Bad/Bcl-xl y así liberando Bcl-xl para permitir la supervivencia celular. Segundo, NF- $\kappa$ B, que se mantiene inactivo en el citoplasma mediante la asociación con proteínas inhibitoras de la familia I kappa-B (I $\kappa$ -B), puede activarse por interacción con cinasa inductora de NF- $\kappa$ B (NIK), o puede activarse por la ruta de señalización de AKT. De este modo, AKT activada (es decir, p-AKT) activa una molécula inhibidora de NF- $\kappa$ B de la familia I $\kappa$ -B (por ejemplo, I $\kappa$ -B $\alpha$ ) mediante la fosforilación intermedia del complejo de multiproteínas de cinasa I $\kappa$ -B (IKK- $\alpha/\beta$ ); la activación de una I $\kappa$ -B conduce a su degradación y liberación de NF- $\kappa$ B previamente unida, que conduce a la activación de este factor de transcripción. La forma activa de NF- $\kappa$ B puede entonces translocarse en el núcleo y regular la expresión de cientos de genes para oponerse a la apoptosis. Otro medio por el que la AKT promueve la supervivencia celular y se opone a la apoptosis es por fosforilación de la proteasa caspasa 9 o factores de transcripción forkhead tales como FKHL1.

Los procedimientos de la presente invención para identificar sujetos que tienen una enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria que se beneficiarían del tratamiento con un agente terapéutico anti-CD40 que bloquea o interfiere con la señalización de CD40 mediada por CD40L comprenden el uso de un ensayo de pronóstico *ex vivo* para monitorizar los efectos de agentes terapéuticos anti-CD40 sobre la señalización de CD40 mediante las rutas de señalización de AKT y NF- $\kappa$ B. De este modo, una muestra biológica de prueba recogida de un sujeto candidato se pone en contacto con el agente terapéutico anti-CD40 de interés durante un tiempo suficiente para permitir la modulación de la señalización de CD40 mediada por CD40L como se observa en el presente documento más adelante, y esa muestra se ensaya entonces para cambios en el nivel de expresión de al menos un biomarcador de señalización de CD40 seleccionado del grupo que consiste en AKT fosforilada (p-AKT), PI3K fosforilada (p-PI3K), PDK1 fosforilada (p-PDK1), IKK- $\alpha/\beta$  fosforilada (p-IKK- $\alpha/\beta$ ), I $\kappa$ -B fosforilada (p-I $\kappa$ -B; por ejemplo, p-I $\kappa$ -B $\alpha$ ) y NF- $\kappa$ B activada. La detección de niveles disminuidos de la expresión de estos biomarcadores fosforilados en una muestra biológica de prueba que comprende células estimuladas con CD40L que expresan CD40 en respuesta a incubación con un agente terapéutico anti-CD40 con respecto a los observados para una muestra biológica de control es indicativa de regulación por disminución de la señalización de CD40 mediada por CD40L, y por tanto indicativa de un desenlace positivo del tratamiento con ese agente terapéutico anti-CD40. En algunas realizaciones, el nivel de

expresión de cualquier biomarcador de señalización de CD40 dado a través de rutas de señalización de AKT y NF- $\kappa$ B se reduce al menos aproximadamente el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o el 100% con respecto al detectado en la muestra biológica de control.

5 La interacción CD40/CD40L también conduce a la activación de las cascadas de señalización de MAPK que incluyen la ruta de señalización de MEK/ERK, la ruta de señalización de MEK/p38 y la ruta de señalización de MEKK/JNKK/JNK. Todas las rutas de MAPK operan mediante los eventos de fosforilación secuencial para fosforilar factores de transcripción y regular la expresión génica. También pueden fosforilar dianas citosólicas para regular eventos intracelulares. Estas cascadas participan en la regulación de la proliferación celular, diferenciación, desarrollo, ciclo celular y transmisión de señales oncogénicas. De particular interés para los procedimientos son la  
10 activación de las rutas de señalización de MEK/ERK y MEK/p38.

Las MAP cinasas (también denominadas proteínas cinasas reguladas por señales extracelulares, o ERK) son las enzimas terminales en una cascada de tres cinasas, en las que cada enzima fosforila y así activa el siguiente miembro en la secuencia. Cada módulo de MAPK consiste en tres proteínas cinasas: una cinasa cinasa MAPK (o MEKK) que activa una cinasa MAPK (o MEK), que a su vez activa una enzima MAPK/ERK. Las MEKK son proteínas cinasas específicas de serina/treonina que fosforilan dualmente, y así activan una o más de las MEK enzimas sobre residuos de Ser o Thr (Ser-X-X-X-Ser/Thr) dentro del núcleo catalítico. Las MEK son proteínas cinasas específicas de serina/treonina/tirosina que activan MAPK fosforilando tanto Thr como Tyr dentro de la secuencia consenso TXY de las MAPK. Esta fosforilación dual se requiere para la activación. ERK1 (p44), ERK2 (p42), p38/HOG y JNK/SAPK representan MAPK terminales relacionadas, aunque distintas, en rutas paralelas.

Los procedimientos de la invención para identificar sujetos que tienen una enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria que se beneficiarían del tratamiento con un agente terapéutico anti-CD40 comprenden el uso de un ensayo de pronóstico *ex vivo* para monitorizar los efectos de agentes terapéuticos anti-CD40 sobre la señalización de CD40 mediante las rutas de MEK/ERK y MEK/p38. De este modo, una muestra biológica de prueba recogida de un sujeto candidato se pone en contacto con el agente terapéutico de interés durante un tiempo suficiente para permitir la modulación de la señalización de CD40 mediada por CD40L como se observa en el presente documento más adelante, y esa muestra se ensaya entonces para cambios en el nivel de expresión de al menos un biomarcador de señalización de CD40 seleccionado del grupo que consiste en MEK fosforilada (p-MEK), por ejemplo, p-MEK1, p-MEK2, p-MEK3 y p-MEK6, ERK fosforilada (p-ERK), por ejemplo, p-ERK1 o p-ERK2, y p38 fosforilada (p-p38). La detección de niveles disminuidos de expresión de estos biomarcadores fosforilados en una muestra biológica de prueba que comprende células estimuladas con CD40L que expresan CD40 en respuesta a incubación con un agente terapéutico anti-CD40 con respecto a la observada para una muestra biológica de control es indicativa de regulación por disminución de la señalización de CD40 mediada por CD40L, y por tanto indicativa de un desenlace de tratamiento positivo con ese agente terapéutico anti-CD40. En algunas realizaciones, el nivel de expresión de cualquier biomarcador de señalización de CD40 dado mediante las rutas de MEK/ERK y MEK/p38 se reduce al menos aproximadamente el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o el 100% con respecto al detectado en la muestra biológica de control.

La sensibilidad de un sujeto candidato a terapia con un agente terapéutico anti-CD40 que bloquea o interfiere con la señalización de CD40 mediada por CD40L también puede evaluarse monitorizando *ex vivo* efectos del agente terapéutico sobre el nivel de expresión de cualquiera de los marcadores de citocina de señalización de CD40 mediada por CD40L. La interacción de CD40 por su ligando natural *in vivo* produce la regulación por incremento de varias citocinas proinflamatorias que dependen del tipo de célula que expresa CD40. La estimulación de CD40L *ex vivo* de linfocitos B normales produce la regulación por incremento de la producción de varias citocinas, que incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), interleucina (IL)-6, IL-8, IL-10, factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1) y proteína 1 $\beta$  inflamatoria de macrófagos (MIP-1 $\beta$ ), mientras que la estimulación de CD40L *ex vivo* de monocitos produce la regulación por incremento de la producción de VEGF, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , MCP-1 y MIP-1 $\beta$  como se observa en el presente documento más adelante.

Según los procedimientos de cribado, una muestra biológica de prueba recogida de un sujeto candidato se pone en contacto con el agente terapéutico anti-CD40 de interés durante un tiempo suficiente para permitir la modulación de la señalización de CD40 mediada por CD40L como se observa en el presente documento más adelante, y esa muestra se ensaya entonces para cambios en el nivel de expresión de al menos un marcador de citocinas seleccionado del grupo que consiste en VEGF, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , MCP-1 y MIP-1 $\beta$ . El nivel de expresión de citocinas puede llevarse a cabo usando cualquier procedimiento de detección conocido en la técnica como se observa en el presente documento más adelante. La detección de niveles disminuidos de expresión de estos marcadores de citocina en una muestra biológica de prueba que comprende células estimuladas con CD40L que expresan CD40 en respuesta a incubación con un agente terapéutico anti-CD40 con respecto a la observada para una muestra biológica de control es indicativa de la regulación por disminución de la señalización de CD40 mediada por CD40L, y por tanto indicativa de un desenlace de tratamiento positivo con ese agente terapéutico anti-CD40. En algunos ejemplos, el nivel de expresión de cualquier citocina dada se reduce al menos aproximadamente el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o el

100% con respecto al detectado en la muestra biológica de control.

Las rutas de señalización de AKT, NF- $\kappa$ B y MAPK participan todas en la proliferación y supervivencia celular. En el sistema inmunitario, la apoptosis desempeña una función importante en la selección del repertorio de linfocitos T, deleción de linfocitos T y B auto-reactivos, eliminación de linfocitos T efectores periféricos tras la terminación de una respuesta inmunitaria, regulación de memoria inmunológica, y en la citotoxicidad de células diana por CTL y linfocitos NK. Agentes terapéuticos que pueden bloquear la señalización de la supervivencia de CD40 sobre células que expresan CD40 y promueven procesos apoptóticos celulares pueden ser beneficiosos en el tratamiento de enfermedades que tienen un componente autoinmune y/o inflamatorio que está asociado a señalización de CD40 mediada por CD40L.

Así, además de monitorizar la señalización de CD40 sobre células que expresan CD40, los procedimientos para identificar sujetos que tienen una enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria que se beneficiarían del tratamiento con un agente terapéutico anti-CD40 comprenden el uso de ensayos de pronóstico *ex vivo* que monitorizan los efectos de agentes terapéuticos anti-CD40 sobre la expresión de uno o más biomarcadores de apoptosis, particularmente proteínas pro-apoptóticas celulares, que incluyen, pero no se limitan a, proteínas caspasas escindidas y poli ADP-ribosa polimerasa escindida (PARP). Biomarcadores de apoptosis adicionales que pueden ensayarse incluyen, pero no se limitan a, alteraciones en la membrana plasmática en la superficie celular, por ejemplo, presencia de fosfotidilserina (PS) de la superficie celular, y escisión o fragmentación de ADN genómico. La PS normalmente se localiza exclusivamente en el lado interno de la membrana plasmática, pero se transloca a la superficie externa de la célula durante las fases tempranas de la muerte apoptótica de células durante la cual la membrana celular permanece intacta. La presencia de PS de la superficie celular y la fragmentación de ADN genómico puede detectarse, por ejemplo, por tinción con anexina V y tinción TUNEL, respectivamente, como se observa en el presente documento más adelante. La detección de niveles elevados de expresión de uno o más de estos biomarcadores de apoptosis en una muestra biológica de prueba que comprende células estimuladas con CD40L que expresan CD40 en respuesta a incubación con un agente terapéutico anti-CD40 con respecto a la observada en una muestra biológica de control es indicativa de un desenlace de tratamiento positivo con ese agente terapéutico anti-CD40. En algunas realizaciones, el nivel de expresión de cualquier biomarcador de apoptosis dado se eleva al menos aproximadamente el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, o más con respecto al detectado en la muestra biológica de control.

Alternativamente, o en combinación con los ensayos *ex vivo* descritos anteriormente, los procedimientos comprenden el uso de ensayos de pronóstico *ex vivo* que monitorizan los efectos de agentes terapéuticos anti-CD40 sobre la expresión de una o más proteínas que son biomarcadores de proliferación celular y/o supervivencia celular, que incluyen, pero no se limitan a, una proteína antiapoptótica que es un miembro de la familia Bcl-2, una proteína inhibidora de la apoptosis IAP y factor 1 asociado a receptor de TNF (TRAF-1). La detección de niveles disminuidos de expresión de estos biomarcadores de proliferación celular y/o supervivencia celular en una muestra biológica que comprende células estimuladas con CD40L que expresan CD40 en respuesta a incubación con un agente terapéutico anti-CD40 con respecto a la observada en una muestra biológica de control es indicativa de un desenlace de tratamiento positivo con ese agente terapéutico anti-CD40. En algunos ejemplos, el nivel de expresión de cualquier biomarcador dado de proliferación celular y/o supervivencia celular se reduce al menos aproximadamente el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o el 100% con respecto al detectado en la muestra biológica de control.

Los miembros de la familia caspasa de proteínas son efectores importantes de la apoptosis celular. Las caspasas son cisteína proteasas que existen dentro de la célula como pro-formas inactivas o los llamados "zimógenos". Los zimógenos se escinden para formar enzimas activas tras la inducción de apoptosis tanto por la ruta mediada por el receptor de la muerte como la ruta de apoptosis mitocondrial. Véase, por ejemplo, Gupta y col. (2003) Intl. J. Oncol. 22:15-20. Dependiendo de la ruta apoptótica, diferentes caspasas inician el proceso apoptótico, iniciando la caspasa-8 y -10 la ruta del receptor de la muerte, e iniciando la caspasa-9 la ruta mitocondrial. Entonces, las caspasas de iniciador activo activan (es decir, escinden) caspasas efectoras, por ejemplo, caspasa-3, -6, y -7, para inducir apoptosis. Estas caspasas efectoras escinden proteínas celulares clave que conducen a los cambios morfológicos típicos observados en células que experimentan apoptosis.

Así, los procedimientos de la presente invención para identificar sujetos que tienen una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria que se beneficiarían del tratamiento con un agente terapéutico anti-CD40 comprenden el uso de ensayos de pronóstico *ex vivo* para monitorizar la proteólisis de proteínas celulares específicas asociadas a apoptosis. Por ejemplo, la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP-1) es específicamente escindida durante la apoptosis. PARP-1 es una proteína que se une a ADN que cataliza la adición de cadenas de poli(ADP-ribosa) a algunas proteínas nucleares y se cree que desempeña una función crítica en la reparación de daños en el ADN. La PARP-1 es rápidamente activada durante estrés celular, tal como choque térmico, radiación ionizante, exposición a carcinógenos y tratamiento con agentes de quimioterapia (Scovassi y Poirier (1999) Mol. Cell Biochem. 199:125-137; Willie (1997) Eur. J. Cell Biol. 73:189-197). Durante la apoptosis, la caspasa-3 activada (es decir, escindida) escinde a su vez PARP-1; en realidad, la resolución de los fragmentos proteolíticos de 89 kDa y 24 kDa se acepta como un distintivo de apoptosis (Scovassi y Poirier (1999) arriba; Willie y col. (1997) arriba). Los

ensayos de pronóstico *ex vivo* descritos en el presente documento monitorizan cambios en el nivel de una o más proteínas caspasas escindidas, por ejemplo, caspasa-3 escindida, caspasa-7 escindida y caspasa-9 escindida, y opcionalmente, el nivel de PARP-1 escindida, PS de la superficie celular y/o fragmentación de ADN genómico, en una muestra biológica de prueba obtenida de un sujeto candidato en respuesta a agentes terapéuticos anti-CD40 que modulan la señalización de CD40 mediada por CD40L y/o modulan ADCC. Niveles elevados de biomarcadores apoptóticos dentro de una muestra biológica pueden detectarse usando cualquier procedimiento conocido para aquellos expertos en la materia, que incluyen aquellos descritos en el presente documento más adelante.

Los biomarcadores de supervivencia y proliferación celular incluyen, pero no se limitan a, proteínas antiapoptóticas que son miembros de la familia Bcl-2 de proteínas. La familia Bcl-2 de proteínas, que comprende al menos 16 miembros, participa en la regulación de apoptosis celular. Algunos de los miembros de la familia son antiapoptóticos, por ejemplo, Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, Bcl-w y Al, y así biomarcadores de supervivencia celular, y otros son pro-apoptóticos (por ejemplo, Bid, Bim, Bik, Bmf, Bad, Hrk, BNIP3, Bax, Bak y Bok) y así biomarcadores de actividad apoptótica. Se ha sugerido que los miembros de la familia Bcl-2 actúan mediante muchos mecanismos diferentes, que incluyen formación de poros en la membrana mitocondrial externa, a través de la cual pueden escapar citocromo c (Cyt c) y otras proteínas intermembrana; y heterodimerización entre miembros de la familia pro- y antiapoptóticos.

Efectos de agentes terapéuticos anti-CD40 sobre la señalización de CD40 y modulación de apoptosis pueden evaluarse con los ensayos de pronóstico *ex vivo* descritos en el presente documento para monitorizar uno o más de estos biomarcadores de supervivencia/apoptosis celular. Biomarcadores de supervivencia celular que son de particular interés incluyen, pero no se limitan a, las proteínas antiapoptóticas Bcl-xl y Mcl-1.

El gen *bcl-2*, que codifica la proteína de la membrana mitocondrial Bcl-2, se identificó por primera vez en linfomas de linfocitos B (Tsujiyama y col. (1984) *Science* 226:1097) en los que la lesión genética causal se ha caracterizado como una translocalización cromosómica (t(14:18)) que pone el gen *bcl-2* bajo el control del promotor de inmunoglobulinas. La expresión en exceso resultante de Bcl-2 retarda la evolución normal de la muerte de células apoptóticas que de otro modo mantiene la homeostasis de linfocitos B, produciendo acumulación de linfocitos B y linfoma folicular (Adams y Cory, 1998; Cory (1994) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 345:289). Bcl-2 pueden existir como homodímero o puede formar un heterodímero con bax. Como homodímero, bax funciona para inducir apoptosis. Sin embargo, la formación de un complejo de bax-Bcl-2 bloquea la apoptosis. La expresión de Bcl-2 también puede desempeñar una función en el desarrollo de resistencia a fármacos.

Posteriormente se han caracterizado varios genes con homología por el gen *bcl-2*, que incluyen los siguientes: *al*, que codifica la proteína Al de 80 aminoácidos que es rápidamente inducida en macrófagos en respuesta a GM-CSF o LPS (Lin y col. (1993) *J. Immunol.* 151: 1979-1988); *mcl-1*, un gen de respuesta temprana en líneas celulares mieloides que experimenta diferenciación de macrófagos (Kozopas y col. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3516-3520); y *bak*, un homólogo de *bcl-2* que puede potenciar la apoptosis (Chittenden y col. (1995) *Nature* 374:733; Kiefer y col. (1995) *Nature* 374:736). También se han identificado otras proteínas que interactúan con y/o están estructuralmente relacionadas con el producto génico de *bcl-2* tales como, por ejemplo, Bcl-xl, y Bcl-xs (Boise y col. (1993) *Cell* 74:597); Ced-9 (Vaux y col. (1992) *Science* 258:1955).

El producto génico de *bcl-x*, Bcl-x, que está estrechamente relacionado con la proteína Bcl-2, también protege células de la apoptosis. El corte y empalme alternativo de Bcl-x humano puede producir al menos dos especies de ARNm de Bcl-x distintas, Bcl-xl y Bcl-xs. El producto de proteína predominante (233 aminoácidos) del ARNm de *bcl-x* más largo, Bcl-xl, inhibe la muerte celular tras la retirada del factor de crecimiento (Boise y col. (1993) *Cell* 74:597-608) y su expresión transgénica altera la maduración de timocitos que conduce a elevados números de timocitos maduros (Chao y col. (1995) *J. Exp. Med.* 182:821-828; Grillot y col. (1995) *J. Exp. Med.* 182:1973-1983).

El gen *mcl-1* asociado a leucemia de células mieloides codifica una proteína, Mcl-1, que se expresa pronto durante la programación de la diferenciación en leucemia de células mieloides (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de la patente de EE.UU. nº 20020086321). La porción de carboxilo de Mcl-1 comparte homología con Bcl-2. Al igual que otros miembros de la familia Bcl-2, Mcl-1 se caracteriza por una asociación con la programación de transiciones en muerte celular, tal como de viabilidad a muerte o de proliferación a diferenciación.

Además de miembros de la familia Bcl-2, los biomarcadores de supervivencia celular incluyen miembros de la familia de genes de inhibidores de apoptosis relacionados con el gen IAP de baculovirus (Bimbaum y col. (1994) *J. Virol.* 68:2521-2528; Clem y col. (1994) *Mol. Cell Biol.* 14:5212-5222; Duckett y col. (1996) *EMBO J.* (1996) 15:2685-2694; Hay y col. (1995) *Cell* 83:1253-1262; Liston y col. (1996) *Nature* 379:349-353; Rothe y col. (1995) *Cell* 83:1243-1252; Roy y col. (1995) *Cell* 80:167-178). Se han identificado al menos ocho IAP humanas (Salvesen y Duckett (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3 :401-410).

Las IAP se conservan altamente evolutivamente; comparten una arquitectura similar organizada en una a tres repeticiones de IAP de baculovirus (BIR) de Cys/His del extremo amino de aproximadamente 70 aminoácidos y por un dominio de unión a cinc del extremo carboxi, designado dedo RING. Las proteínas de la familia IAP son reconocidas por tener funciones posiblemente importantes en la regulación de apoptosis y tumorigénesis (Deveraux

y Reed (1999) *Genes Dev.* 13:239-252; Tamm y col. (2000) *Clin. Cancer Res.* 6:1796-1803).

Las IAP suprimen muerte celular inhibiendo caspasas aguas arriba y terminales (véase, por ejemplo, Thompson (1995) *Science* 267:1456). Las formas activas (es decir, escindidas) de caspasa-3 y -7 son directamente inhibidas por XIAP, c-IAP1 y c-IAP2 (véase, por ejemplo, Roy y col. (1997), arriba), que también pueden prevenir el procesamiento proteolítico de pro-caspasa-3, -6 y -7 bloqueando la activación inducida por citocromo c de pro-caspasa-9 (Deveraux y col. (1998) *EMBO J.* 17:2215-2223). Los usos terapéuticos y de diagnóstico de ácidos nucleicos que codifican diversos inhibidores de la apoptosis relacionados con un miembro de la familia IAP se han descrito en la bibliografía de patente. Véanse, por ejemplo, las solicitudes de patente internacionales nº WO 97/06255, WO 97/26331 y WO 97/32601. Ejemplos de proteínas IAP que pueden usarse como biomarcadores de supervivencia celular incluyen, pero no se limitan a, XIAP, cIAP1, IAP2 y survivina.

XIAP es el inhibidor más ampliamente expresado y más potente de caspasas (véase, por ejemplo, Takahashi y col. (1998) *J. Biol. Chem.* 273:7787; Reed (1994) *J. Cell Biol.* 124:1). La survivina es una proteína citoplásmica de aproximadamente 16,5 kDa (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 20030100525) que contiene una única BIR, y una región de superenrollamiento del extremo carboxilo altamente cargada en lugar de un dedo RING, que inhibe la apoptosis inducida por la retirada de factor de crecimiento (IL-3) cuando se transfiere a precursores de linfocitos B (Ambrosini y col. (1997) *Nature Med.* 3:917-921). La expresión en exceso de la proteína survivina exógena rescata células de la apoptosis inducida por p53 de un modo dependiente de la dosis, sugiriendo que la pérdida de survivina media, al menos, en parte en la ruta apoptótica dependiente de p53 (Mirza y col. (2002) *Oncogene* 21:2613-2622).

Otro biomarcador representativo de supervivencia celular para su uso en los procedimientos es TRAF-1. Los miembros de la familia TRAF se unen al dominio citoplásmico de CD40 y median en la activación de múltiples rutas de señalización que regulan la supervivencia de linfocitos B, proliferación, diferenciación, cambio de isotipo, desarrollo del centro germinal y la respuesta de memoria humoral (véase, por ejemplo, Pullen y col. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:14246-14254). Se ha informado que la activación del receptor de CD40 puede producir transcripción del gen *TRAF-1* (Schwenzer y col. (1999) *J. Biol. Chem.* 274(27):19368-19374) y una fuerte regulación por incremento de la expresión de TRAF-1 en monocitos humanos (Pearson y col. (2001) *Internat. Immunol.* 13(3):273-283). Los cambios en la expresión génica de *TRAF-1* en respuesta a la activación de receptor de CD40 pueden ser predictivos de la eficacia de fármacos, proporcionándose así un biomarcador adecuado para evaluar y/o monitorizar los efectos de anti-CD40 terapéuticos sobre la señalización de CD40 mediada por CD40L y modulación de supervivencia/apoptosis celular. Cambios en la expresión de *TRAF-1* pueden detectarse fácilmente en tanto el nivel de ARNm por técnicas tales como transferencia Northern o RT-PCR cuantitativa como al nivel de proteína, por ejemplo, por transferencia Western, como se observa en el presente documento más adelante.

Los anteriores biomarcadores de supervivencia celular pueden monitorizarse en los ensayos de pronóstico *ex vivo* descritos en el presente documento en cualquier combinación, que incluyen uno o todos de estos biomarcadores, además de en combinación con otros biomarcadores de proliferación celular. Así, en una realización, los ensayos de pronóstico *ex vivo* descritos en el presente documento también se usan para monitorizar en una muestra biológica de prueba de un sujeto candidato la expresión del biomarcador de proliferación celular Ki67.

Ki67 es una proteína nuclear relacionada con el ciclo celular que está presente en los núcleos de células en las fases G1, S, M y G2 de células en división, pero no en la fase G0 de células quiescentes (Gerdes y col. (1984) *J. Immunol.* 133, 1710-1715). Por esto motivo se usa como marcador de proliferación celular.

Así, los biomarcadores que van a monitorizarse en los ensayos de pronóstico *ex vivo* incluyen las proteínas de supervivencia celular y apoptótica descritas anteriormente, y proteínas que participan en las rutas de señalización de CD40 como se observa en el presente documento anteriormente. La monitorización puede ser al nivel de proteína o ácido nucleico. Así, los biomarcadores incluyen estas proteínas y los genes que codifican estas proteínas. Si la detección es al nivel de proteína, la proteína biomarcadora comprende el polipéptido de longitud completa o cualquier fragmento detectable del mismo, y puede incluir variantes de estas secuencias de proteína. Similarmente, si la detección es al nivel de nucleótido, el ácido nucleico biomarcador incluye ADN que comprende la secuencia codificante de longitud completa, un fragmento de la secuencia codificante de longitud completa, variantes de estas secuencias, por ejemplo, variantes o variantes de corte y empalme que se producen naturalmente, o el complemento de una secuencia tal. Los ácidos nucleicos biomarcadores también incluyen ARN, por ejemplo, ARNm, que comprende la secuencia de longitud completa que codifica la proteína biomarcadora de interés, un fragmento de la secuencia de ARN de longitud completa de interés, o variantes de estas secuencias. Las proteínas biomarcadoras y ácidos nucleicos biomarcadores también incluyen variantes de estas secuencias. Por "fragmento" está previsto una parte del polinucleótido o una parte de la secuencia de aminoácidos y, por tanto, la proteína así codificada. Los polinucleótidos que son fragmentos de una secuencia de nucleótidos biomarcadora generalmente comprenden al menos 10, 15, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 800, 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300 ó 1.400 nucleótidos contiguos, o hasta el número de nucleótidos presentes en un polinucleótido biomarcador de longitud completa desvelado en el presente documento. Un fragmento de un polinucleótido biomarcador codificará generalmente al menos 15, 25, 30, 50, 100, 150, 200 ó 250 aminoácidos contiguos, o hasta el número total de aminoácidos presentes en una proteína biomarcadora de longitud completa. "Variante" pretende

significar secuencias sustancialmente similares. Generalmente, las variantes de un biomarcador particular de la invención tendrán al menos aproximadamente el 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad de secuencias con ese biomarcador como se ha determinado por programas de alineamiento de secuencias conocidos en la técnica. La proteína y la secuencia codificante correspondiente para cada uno de estos marcadores se conoce en la técnica. Véase la Tabla 6 en el Ejemplo 3 en el presente documento más adelante.

*Factores relacionados con CD40 y marcadores de pronóstico clínicamente útiles para su uso en otros ensayos de pronóstico.*

También pueden identificarse Individuos o subpoblaciones de pacientes que tienen una enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria que se beneficiarían del tratamiento con agentes terapéuticos anti-CD40 usando ensayos de pronóstico que buscan la presencia o ausencia de, o niveles elevados o disminuidos de, uno o más factores relacionados con CD40. Los sujetos identificados como que son sensibles a tratamiento con un agente terapéutico anti-CD40 basándose en estos factores relacionados con CD40 pueden tratarse con el agente terapéutico anti-CD40. Alternativamente, pueden cribarse adicionalmente para posible beneficio del tratamiento con agentes terapéuticos anti-CD40 usando los ensayos de pronóstico *ex vivo* descritos en el presente documento, por ejemplo, para identificar si la enfermedad inflamatoria o la enfermedad autoinmunitaria sería o no más sensible a tratamiento con un agente terapéutico anti-CD40 que bloquee la señalización de CD40 mediada por CD40L, o que modulara la actividad de ADCC, o que tiene ambos de estos modos de acción.

Factores relacionados con CD40 de interés incluyen, pero no se limitan a, nivel de expresión del antígeno CD40 de la superficie celular, nivel de expresión de CD40L de la superficie celular, niveles en circulación de CD40 soluble (CD40s) y niveles en circulación de CD40L soluble (CD40Ls). De este modo, una muestra biológica recogida de un sujeto candidato se analiza para nivel de expresión de al menos uno de estos factores relacionados con CD40. El nivel de expresión de estos factores relacionados con CD40 puede usarse como marcadores de pronóstico para enfermedades autoinmunitarias y/o enfermedades inflamatorias. Pueden ser útiles como diagnósticos de sujetos que responderían o no a agentes terapéuticos anti-CD40.

Cualquier procedimiento conocido en la técnica puede usarse para el análisis de estos marcadores. Pueden medirse niveles en circulación de CD40s o CD40Ls, por ejemplo, en una muestra de sangre obtenida de un sujeto candidato, por ejemplo, por ELISA, radioinmunoensayo (RIA), electroquimioluminiscencia (ECL), transferencia Western, tecnologías de multiplexado u otros procedimientos similares. La expresión en la superficie celular de CD40 o CD40L puede medirse, por ejemplo, por citometría de flujo, inmunohistoquímica, transferencia Western, inmunoprecipitación, selección con perlas magnéticas y cuantificación de células que expresan cualquiera de estos marcadores de la superficie celular. Los niveles de expresión de ARN de CD40 y CD40L podrían medirse por RT-PCR, Qrt-PCR, micromatriz, transferencia Northern u otras tecnologías similares. Las secuencias para el antígeno CD40, CD40L y CD40L soluble se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, la Tabla 7 en el Ejemplo 3 en el presente documento más adelante. En algunas realizaciones, la CD40s se aísla y se secuencian para determinar una distinción entre CD40s que es secretada por las células que expresan CD40 frente a CD40s que es proteolíticamente escindida de la superficie de estas células. El nivel de expresión de CD40s secretada y/o CD40s proteolíticamente escindida puede correlacionarse con el estado de enfermedad y/o con sensibilidad de la enfermedad a tratamiento con un agente terapéutico anti-CD40 de interés.

Las subpoblaciones de pacientes que tienen una enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria que se beneficiarían del tratamiento con un agente terapéutico anti-CD40 se identifican cribando sujetos candidatos para uno o más marcadores de pronóstico clínicamente útiles conocidos en la técnica. Ejemplos de marcadores clínicamente útiles incluyen, pero no se limitan a, interleucina del suero (IL)-18, cuyos niveles se refieren a la gravedad de cirrosis biliar primaria (Yamano y col. (2000) Clin. Exp. Immunol. 122:227-231); molécula 1 de adhesión intercelular soluble (ICAM-1), cuya expresión es mayor en cirrosis biliar primaria tardía que en enfermedad temprana, y que se correlaciona con progresión histológica (Lim y col. (1994) Hepatology 20:882-888); la expresión celular de moléculas de adhesión a células similares a ICAM-1 y CD40, que sirve para predecir del desenlace de nefritis lúpica (Daniel y col. (2001) Kidney Int. 60:2215-2221); niveles de receptor de IL-2 soluble del suero (sIL-2R), que parece ser un monitor excelente de la actividad de enfermedad clínica en artritis reumatoide (AR) (Wood y col. (1988) J. Autoimmun. 1:353-361); proteína intestinal de resistencia a múltiples fármacos (MDR1), cuyo nivel es un poderoso indicador de pronóstico para el desenlace de trasplante de hígado de donante vivo (Hashida y col. (2001) Clin. Pharmacol. Ther. 69:308-316); aminopeptidasa de leucina del suero, cuyos niveles elevados puede ser un indicador de actividad para lupus eritematoso sistémico (Inokuma y col. (1999) Rheumatology (Oxford) 38:705-708); proteína C reactiva, que es un indicador general de inflamación; y anti-tripsina alfa 1, que es un indicador de actividad de enfermedad en enfermedad de Crohn, colitis e ileítis (Meyers y col. (1985) Gastroenterology 89:13-18).

Así, subpoblaciones de pacientes con enfermedades autoinmunes y/o inflamatorias que son menos sensibles a terapéuticos existentes pueden ser fácilmente identificados por procedimientos de ensayo actualmente usados, que incluyen ensayos de pronóstico desvelados en el presente documento que utilizan uno o más de estos marcadores de pronóstico clínicamente útiles. Habiendo identificado un sujeto que se clasifica en una de estas subpoblaciones basándose en estos marcadores de pronóstico clínicamente útiles, el sujeto puede cribarse adicionalmente usando

uno o más de los ensayos de pronóstico *ex vivo* identificados anteriormente en el presente documento para evaluar el beneficio de tratar este sujeto con un terapéutico anti-CD40 que modula la señalización de CD40 mediada por CD40L y/o actividad de ADCC.

## 5 Ensayos de pronóstico

El posible beneficio terapéutico con un agente terapéutico anti-CD40 que modula la señalización de CD40 mediada por CD40L, modula ADCC, o ambos, se evalúa usando ensayos de pronóstico *ex vivo* que monitorizan cambios en el nivel de expresión de uno o más de los biomarcadores anteriormente mencionados de proliferación y supervivencia celular, apoptosis celular y rutas de señalización de CD40 en una muestra biológica que se recoge de un sujeto candidato que está en necesidad de intervención terapéutica para una enfermedad autoinmunitaria y/o enfermedad inflamatoria que está mediada por estimulación de la señalización de CD40 sobre células que expresan CD40. Por “célula que expresa CD40” está previsto células que expresan el antígeno CD40. Los procedimientos para detectar la expresión de CD40 en células son muy conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, técnicas de PCR, inmunohistoquímica, citometría de flujo, transferencia Western, ELISA y similares. Si los ensayos *ex vivo* generan un cambio favorable en el nivel de expresión de uno o más biomarcadores de interés dentro de la muestra biológica, se garantiza la intervención del tratamiento con el agente terapéutico anti-CD40. Además, los biomarcadores, marcadores de citocinas y factores relacionados con CD40 tratados en el presente documento pueden usarse para monitorizar la eficacia del tratamiento de un agente terapéutico anti-CD40 en un sujeto, que puede o no haber sido cribado usando los ensayos de pronóstico *ex vivo* desvelados en el presente documento, y así determinar si se garantiza o no tratamiento adicional con el mismo agente terapéutico anti-CD40, o si son o no necesarios o deseables protocolos de tratamiento alternativos. Si el tratamiento con un agente terapéutico anti-CD40 se garantiza como se ha determinado por los procedimientos de la presente invención, el agente terapéutico puede administrarse por cualquier vía de administración adecuada.

El sujeto candidato que se considera para la intervención del tratamiento con un agente terapéutico anti-CD40 que modula la señalización de CD40 mediada por CD40L, modula ADCC, o ambos, puede estar aquejado de, o en riesgo de desarrollar o recaer de, cualquier enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria que está mediada por señalización de CD40 sobre células que expresan CD40. Las enfermedades inflamatorias se caracterizan por inflamación y destrucción de tejido, o una combinación de ambos. La “enfermedad inflamatoria” incluye cualquier proceso inflamatorio inmuno-mediado en el que el evento iniciador o diana de la respuesta inmunitaria implica no auto-antígeno(s), que incluye(n), por ejemplo, aloantígenos, xenoantígenos, antígenos virales, antígenos bacterianos, antígenos desconocidos o alérgenos.

El término “enfermedad(es) inflamatoria(s)” incluye “enfermedad(es) autoinmunitaria(s)”. Como se usa en el presente documento, se entiende generalmente que el término “autoinmunidad” engloba procesos inflamatorios inmuno-mediados que implican “auto”-antígenos. En enfermedades autoinmunitarias, el (los) auto-antígeno(s) desencadena(n) respuestas inmunitarias del huésped.

Por tanto, los procedimientos desvelados en el presente documento pueden usarse para evaluar la eficacia de un agente terapéutico anti-CD40 para el tratamiento de inflamación asociado a rechazo de trasplante de tejido. “Rechazo de trasplante” o “rechazo de injerto” se refiere a cualquier respuesta inmunitaria organizada por el huésped contra un injerto que incluye, pero no se limita a, antígenos HLA, antígenos de grupos sanguíneos y similares.

La divulgación también puede usarse para evaluar la eficacia de un agente terapéutico anti-CD40 para el tratamiento de enfermedad de injerto frente a huésped tal como, por ejemplo, la asociada a trasplante de médula ósea. En tal enfermedad de injerto frente a huésped, la médula ósea del donante incluye linfocitos y células que maduran en linfocitos. Los linfocitos del donante reconocen los antígenos del receptor como no propios y organizan una respuesta inmunitaria inflamatoria. Por tanto, como se usa en el presente documento, “enfermedad de injerto frente a huésped” o “injerto frente a reacción del huésped” se refiere a cualquier respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T en la que los linfocitos del donante reaccionan a los antígenos del huésped.

Ejemplos de trastornos autoinmunes y/o inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, lupus eritematoso sistémico (LES), lupus discoide, nefritis lúpica, sarcoidosis, artritis inflamatoria, que incluye artritis juvenil, artritis reumatoide, artritis psoriásica, síndrome de Reiter, espondilitis anquilosante y artritis gotosa, rechazo de un trasplante de órgano o tejido, rechazo hiperagudo, agudo o crónico y/o enfermedad de injerto frente a huésped, esclerosis múltiple, síndrome de hiper IgE, poliarteritis nodosa, cirrosis biliar primaria, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca (enteropatía sensible al gluten), hepatitis autoinmune, anemia perniciosa, anemia hemolítica autoinmune, psoriasis, esclerodermia, miastenia grave, púrpura trombocitopénica autoinmune, tiroiditis autoinmune, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad por complejos inmunes, síndrome de fatiga crónica y disfunción inmune (SFCDI), polimiositis y dermatomiositis, crioglobulinemia, trombólisis, cardiomiopatía, pénfigo vulgar, fibrosis pulmonar intersticial, diabetes mellitus tipo I y tipo II, hipersensibilidad de tipo retardado tipo 1, 2, 3 y 4, alergia o trastornos alérgicos, respuestas inmunitarias no deseadas/no intencionadas a proteínas terapéuticas (véase por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. nº US 2002/0119151 y Koren, y col. (2002) Curr. Pharm. Biotechnol. 3:349-60), asma, síndrome de Churg-Strauss (granulomatosis alérgica), dermatitis atópica, dermatitis de contacto alérgica e irritante, urticaria, alergia mediada por

IgE, aterosclerosis, vasculitis, miopatías inflamatorias idiopáticas, enfermedad hemolítica, enfermedad de Alzheimer, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica y similares. Los procedimientos de la presente invención se usan para identificar individuos que se beneficiarían del tratamiento con un agente terapéutico anti-CD40 para inflamación pulmonar que incluyen, pero no se limitan a, rechazo de injerto de pulmón, asma, sarcoidosis, enfisema, fibrosis quística, fibrosis pulmonar idiopática, bronquitis crónica, rinitis alérgica y enfermedades alérgicas del pulmón tales como neumonitis por hipersensibilidad, neumonía eosinófila, bronquiolitis obliterante debida a trasplante de médula ósea y/o pulmón u otras causas, aterosclerosis por injerto / fleboesclerosis por injerto, además de fibrosis pulmonar resultante de colágeno, enfermedades vasculares y autoinmunitarias tales como artritis reumatoide y lupus eritematoso.

Los procedimientos de la invención son útiles para identificar y tratar enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias que son inicialmente resistentes a, o que desarrollan resistencia a, otros tratamientos terapéuticos conocidos cuyo modo de acción es distinto de mediante la modulación de la señalización de CD40 mediada por CD40L, modulación de ADCC, o ambos. Los ensayos de pronóstico *ex vivo* pueden usarse para identificar subpoblaciones de pacientes para las que se desea la intervención del tratamiento con uno o más agentes terapéuticos anti-CD40 que modulan la señalización de CD40 mediada por CD40L, modula ADCC, o ambos.

El término “pronóstico” es reconocido en la materia y engloba predicciones sobre la probable evolución de la respuesta a intervención terapéutica, y la probable evolución de la enfermedad o progresión de la enfermedad, particularmente con respecto a la probabilidad de remisión de la enfermedad, recaída de la enfermedad y muerte. Los ensayos de pronóstico *ex vivo* de la presente invención pueden usarse para predecir la respuesta de un sujeto candidato a un agente terapéutico anti-CD40 particular, o clase de agentes terapéuticos anti-CD40, que modula señalización de CD40 mediada por CD40L, modula ADCC, o ambos. Por “predecir la respuesta de un sujeto candidato” está previsto evaluar la probabilidad de que un sujeto en cuestión experimente un desenlace positivo o negativo con un agente terapéutico anti-CD40 particular. Para los fines de la presente invención, “indicativo de un desenlace de tratamiento positivo” en el contexto de los ensayos de pronóstico *ex vivo* de la presente invención pretende significar una elevada probabilidad de que el sujeto candidato experimente resultados beneficiosos en respuesta a tratamiento con el agente terapéutico anti-CD40 en consideración, y así se garantizaría la intervención del tratamiento con ese agente terapéutico anti-CD40. A diferencia, “indicativo de un desenlace de tratamiento negativo” pretende significar una elevada probabilidad de que el paciente no se beneficie de la intervención del tratamiento con el agente terapéutico anti-CD40 en consideración, y así no se garantizaría la intervención del tratamiento con ese agente terapéutico anti-CD40.

Resultados beneficiosos que pueden lograrse con la intervención del tratamiento con agentes terapéuticos anti-CD40 que modulan la señalización de CD40 mediada por CD40L incluyen cualquier respuesta terapéutica positiva. Por “respuesta terapéutica positiva” con respecto a una enfermedad autoinmunitaria y/o enfermedad inflamatoria está previsto una mejora en la enfermedad en asociación con la actividad antiinflamatoria de estos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y/o una mejora en los síntomas asociados a la enfermedad. Es decir, puede observarse un efecto antiproliferativo, la prevención de proliferación adicional de la célula que expresa CD40, una reducción en la respuesta inflamatoria que incluye, pero no se limita, a secreción reducida de citocinas inflamatorias, moléculas de adhesión, proteasas, inmunoglobulinas (en casos en los que la célula que lleva CD40 sea un linfocito B), combinaciones de los mismos y similares, elevada producción de proteínas antiinflamatorias, una reducción en el número de células autorreactivas, un aumento en la tolerancia inmune, inhibición de la supervivencia de células autorreactivas y/o una disminución en uno o más síntomas mediados por la estimulación de células que expresan CD40. Tales respuestas terapéuticas positivas no se limitan a la vía de administración y pueden comprender la administración al donante, el tejido del donante (tal como, por ejemplo, perfusión de órganos), el huésped, cualquier combinación de los mismos, y similares.

La respuesta clínica puede evaluarse usando técnicas de cribado tales como barrido por resonancia magnética nuclear (RMN), barrido por rayos X, barrido por tomografía computerizada (TC), análisis por citometría de flujo o citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS), histología, patología macroscópica y análisis bioquímico de la sangre, que incluyen, pero no se limitan, a cambios detectables por ELISA, RIA, cromatografía y similares. Además de estas respuestas terapéuticas positivas, el sujeto que se somete a terapia con el agente terapéutico anti-CD40 puede experimentar el efecto beneficioso de una mejora en los síntomas asociados a la enfermedad.

Los ensayos de pronóstico *ex vivo* comprenden proporcionar una muestra biológica de prueba y una muestra biológica de control de un sujeto candidato en necesidad de pronóstico para la intervención del tratamiento con un agente terapéutico anti-CD40 como se observa en el presente documento, comprendiendo las muestras biológicas de prueba y de control células que expresan CD40 que han sido estimuladas con un ligando de CD40, tanto *in vivo* como *ex vivo*; poner en contacto la muestra biológica de prueba con una cantidad eficaz del agente terapéutico anti-CD40 de interés; detectar el nivel de al menos un biomarcador en esta muestra biológica de prueba, estando el biomarcador seleccionado del grupo que consiste en un biomarcador de apoptosis celular, un biomarcador de una ruta de señalización de CD40 mediada por CD40L y un biomarcador de supervivencia celular, dependiendo del modo de acción del agente terapéutico anti-CD40 de interés; y comparar el nivel del (de los) biomarcador(es) en la muestra biológica de prueba con el nivel del (de los) biomarcador(es) en la muestra biológica de control, que no se ha puesto en contacto con el agente terapéutico anti-CD40. Si el agente terapéutico anti-CD40 es un antagonista

que bloquea o interfiere con la señalización de CD40 mediada por CD40L, o bloquea o interfiere con esta señalización y también modula ADCC, los ensayos de pronóstico *ex vivo* desvelados en el presente documento para cualquiera o todos de estos biomarcadores de proliferación y supervivencia celular, apoptosis y señalización de CD40 mediada por CD40L, pueden usarse para evaluar el posible efecto beneficioso del agente terapéutico, solo o en combinación con ensayos para marcadores de citocinas que están regulados por incremento por señalización de CD40 mediada por CD40L, y/o ensayos para uno o más de los factores relacionados con CD40 descritos en el presente documento, con el fin de identificar un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria que sería sensible a tratamiento con ese agente terapéutico anti-CD40. Si el agente terapéutico anti-CD40 tiene su modo de acción modulando actividad de ADCC, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40, el ensayo de pronóstico *ex vivo* para uno o más marcadores de apoptosis puede usarse para evaluar el posible efecto beneficioso del agente terapéutico, solo o en combinación con ensayos para uno o más de los factores relacionados con CD40 descritos en el presente documento, con el fin de identificar un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria que sería sensible a tratamiento con ese agente terapéutico anti-CD40.

El nivel de expresión de uno o más biomarcadores, y opcionalmente uno o más marcadores de citocinas, en una muestra biológica de prueba que se pone en contacto con el agente terapéutico anti-CD40 de interés se compara con el nivel de expresión para el (los) biomarcador(es), y opcionalmente marcador(es) de citocina en una muestra biológica de control. Por "muestra biológica de prueba" está prevista una muestra biológica que comprende células que expresan CD40 obtenidas del sujeto candidato, y que se pondrán en contacto con el agente terapéutico anti-CD40 en consideración para el tratamiento del sujeto candidato. Por "muestra biológica de control" está prevista una muestra biológica que es comparable a la muestra biológica de prueba porque también comprende aproximadamente el mismo número y tipo de células que expresan CD40 y ha sido obtenida del sujeto candidato en el mismo momento de tiempo y de un modo equivalente al usado para obtener la muestra biológica de prueba, y que se someterá a las mismas condiciones experimentales que la muestra de prueba, pero que no se pondrá en contacto con el agente terapéutico anti-CD40 de interés. La muestra biológica de prueba y la muestra biológica de control pueden proporcionarse a partir de una única muestra biológica que ha sido obtenida del sujeto y se divide en submuestras, una de las cuales se designa la muestra biológica de prueba y otra de las cuales se designa la muestra biológica de control. Alternativamente, la muestra biológica de prueba y la muestra biológica de control pueden proporcionarse a partir de dos o más muestras biológicas, que pueden reunirse y luego subdividirse en submuestras como antes, o que pueden representar individualmente las muestras biológicas de prueba y de control.

Aunque se reconoce que las células que expresan CD40 obtenidas del sujeto candidato pueden haberse estimulado constitutivamente por CD40L *in vivo* antes de la recogida de una muestra biológica, es preferible estimular las células que expresan CD40 de las muestras biológicas de prueba y de control *ex vivo* de manera que puedan evaluarse eficazmente efectos antagonistas de un agente terapéutico anti-CD40 sobre las actividades relacionadas con CD40, por ejemplo, estimulación de la proliferación celular y señalización de CD40.

De este modo, antes de poner en contacto la muestra biológica de prueba de células que expresan CD40 con el agente terapéutico anti-CD40 de interés, las células que expresan CD40 dentro de cualquier muestra biológica dada recogida del sujeto candidato pueden estimularse, por ejemplo, con CD40L, para garantizar la regulación por incremento de la señalización de CD40 en las células que expresan CD40 de las muestras biológicas de prueba y de control que van a usarse en el ensayo de pronóstico *ex vivo*. Puede usarse cualquier fuente de CD40L, que incluye, pero no se limita a, CD40L soluble. Otras moléculas estimulantes de CD40 adecuadas pueden incluir, por ejemplo, anticuerpos agonistas que se unen específicamente al dominio extracelular de CD40. Así, moléculas estimulantes de CD40 adecuadas incluyen, pero no se limitan a, CD40L unida a la membrana (por ejemplo, CD40L unida a la membrana plasmática de una célula, por ejemplo, CD40L que expresa transfectantes de células CHO fijadas en formaldehído; o CD40L incorporadas en un sustrato basado en lípidos sintéticos tal como un liposoma o micela), CD40L soluble, un anticuerpo anti-CD40agonista, por ejemplo, el anticuerpo anti-CD40 humana G28-5 (Bristol-Myers Squibb, Seattle, Washington), y mezclas de los mismos. Una cantidad eficaz de una molécula estimulante que va a ponerse en contacto con células de una muestra biológica recogida o submuestra de la misma con el fin de estimular una o más rutas de señalización de CD40 dependerá de factores tales como el tipo de ligando usado (por ejemplo, monomérico o multimérico; solubilidad y permeabilidad, y similares) y la abundancia del receptor de CD40 en las células que expresan CD40. Preferentemente, entre aproximadamente 1,0 nM y aproximadamente 1 mM de CD40L o CD40L soluble se usa para estimular la señalización de CD40.

Las células que expresan CD40 dentro de la muestra biológica o submuestra de la misma se estimulan con CD40L humana recombinante soluble (Alexis Corporation, Bingham, Nottinghamshire, RU) antes de la etapa de puesta en contacto incubando la muestra biológica o submuestra de la misma con CD40L soluble durante un tiempo suficiente para estimular la señalización de CD40. El tiempo de incubación es aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 4 horas. La cantidad de CD40L soluble presente durante el periodo de incubación se determina fácilmente por valoración. La cantidad de CD40L soluble es aproximadamente 1 µg/ml. Cualquier protocolo aceptable para poner en contacto la muestra biológica de prueba con un agente terapéutico anti-CD40 de interés puede usarse en los ensayos de pronóstico *ex vivo*. Los factores a considerar incluyen, pero no se limitan a, el número de células que van a ponerse en contacto dentro de un recipiente que comprende la muestra biológica o submuestra de la misma; la concentración del agente terapéutico anti-CD40 que va a ponerse en contacto con la muestra biológica de prueba; el tiempo de incubación del agente terapéutico anti-CD40 con las células en la muestra

biológica de prueba; si procede, la concentración de una molécula estimulante, por ejemplo, CD40L, CD40L soluble o fragmento estimulante o variante del mismo, que va a ponerse en contacto con la muestra biológica de prueba; y, si procede, el tiempo de incubación de la molécula estimulante con las células en la muestra biológica de prueba. La determinación de tales factores puede llevarse a cabo por aquellos expertos en la materia basándose en variables tales como el tipo de muestra biológica que se prueba, tamaño del recipiente contenedor, el volumen de líquido en el recipiente y la composición química del agente terapéutico anti-CD40 (es decir, tamaño, carga y similares) que se prueban.

En un ejemplo, una muestra biológica de prueba o submuestra de la misma que comprende un número adecuado de células que expresan CD40 se añade a una placa de cultivo de tejido de 96 pocillos. El número de células adecuado es varias células que permiten detectar un cambio en una o más de las actividades mediadas por CD40 (es decir, proliferación celular y supervivencia celular, nivel de apoptosis, rutas de señalización de CD40) usando uno o más de los procedimientos de detección descritos en cualquier parte en el presente documento. El número adecuado de células es entre aproximadamente 1 y aproximadamente  $1 \times 10^6$  células por pocillo de una placa de cultivo de tejido de 96 pocillos. Tras la adición de las células a la placa de cultivo de tejido, las células pueden preincubarse entre aproximadamente 0 y aproximadamente 96 horas antes de poner en contacto las células con el agente terapéutico anti-CD40. Las células se preincuban con una molécula estimulante de CD40 como se observa en el presente documento anteriormente.

Una cantidad eficaz de un agente terapéutico anti-CD40 se añade a las células de la muestra biológica de prueba para proporcionar la regulación de una actividad mediada por CD40 de interés (es decir, señalización de CD40 mediada por CD40L, actividad de ADCC de un agente que se une a CD40, o ambos) de forma que la regulación sea detectable usando uno o más procedimientos de detección desvelados en cualquier parte en el presente documento. La cantidad eficaz dependerá por supuesto del agente terapéutico anti-CD40 que se pruebe. Generalmente, una cantidad eficaz de un agente terapéutico anti-CD40 es entre aproximadamente 1 nM y aproximadamente 10 mM del agente por pocillo de una placa de 96 pocillos. El agente terapéutico anti-CD40 es un anticuerpo anti-CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal completamente humano CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o fragmento de unión a antígeno del mismo, y la cantidad eficaz es aproximadamente 0,01  $\mu\text{g/ml}$  a aproximadamente 30  $\mu\text{g/ml}$ , que incluye aproximadamente 0,01  $\mu\text{g/ml}$ , 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 20  $\mu\text{g/ml}$  y 30  $\mu\text{g/ml}$ , y otros valores tales entre aproximadamente 0,01  $\mu\text{g/ml}$  y aproximadamente 30  $\mu\text{g/ml}$ . Las células dentro de la muestra biológica de prueba o submuestra de la misma se dejan incubar durante una longitud de tiempo adecuada para permitir que el agente terapéutico anti-CD40 interaccione con las células y genere una o más respuestas biológicas. El tiempo de incubación preferido entre el agente terapéutico anti-CD40 y las células de la muestra biológica de prueba o submuestra de la misma es entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 48 horas. En otras realizaciones, el tiempo de incubación es aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 22 horas, o aproximadamente 24 horas.

La(s) muestra(s) biológica(s) que sirve(n) como muestras biológicas de prueba y de control pueden ser cualquier conjunto de células, tejido o fluido corporal que comprenda células que expresan el antígeno CD40. Ejemplos de tales muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a, sangre, linfa, muestras de tejido, frotis y similares. Las muestras biológicas pueden recogerse de un sujeto candidato usando cualquier procedimiento aceptable en la materia, por ejemplo, por aspiración con aguja de fluidos corporales, extirpación de una muestra de tejido y similares. Si una muestra biológica debe almacenarse antes del ensayo, la muestra biológica puede transferirse a un portaobjetos de vidrio o puede congelarse para la posterior preparación o disponerse inmediatamente en un disolución de fijador.

Como se ha observado previamente, la detección del biomarcador de interés al nivel de proteína o nucleótido puede llevarse a cabo usando cualquier procedimiento de detección conocido para aquellos expertos en la materia. Por "detectar la expresión" o "detectar el nivel de" está previsto determinar la cantidad o presencia de una proteína biomarcadora o gen en la muestra biológica. Así, "detectar la expresión" engloba casos en los que se determina que un biomarcador no va a expresarse, no va a expresarse detectablemente, expresarse a un bajo nivel, expresarse a un nivel normal, o expresarse en exceso. Con el fin de determinar el efecto de un agente terapéutico anti-CD40 sobre la señalización de CD40 mediada por CD40L, una muestra biológica de prueba que comprende células que expresan CD40 que han sido estimuladas con un ligando de CD40 (tanto *in vivo* como *ex vivo*) se pone en contacto con el agente terapéutico anti-CD40 durante un tiempo suficiente para permitir que el agente terapéutico ejerza una respuesta celular, y entonces nivel de expresión de uno o más biomarcadores de interés en esa muestra biológica de prueba se compara con el nivel de expresión en la muestra biológica de control que no se ha puesto en contacto con el agente terapéutico anti-CD40. En algunos ejemplos, la muestra biológica de control de células se pone en contacto con una sustancia neutra o control negativo que no interfiere con la señalización de CD40 mediada por CD40L. Por ejemplo, una inmunoglobulina no específica, por ejemplo IgG1, que no se une a CD40 sirve de control negativo. La detección puede producirse durante un transcurso de tiempo que permita la monitorización de cambios en biomarcadores con el tiempo. La detección también puede producirse con exposición a diferentes concentraciones del agente terapéutico anti-CD40 para generar una curva de "dosis-respuesta" para cualquier biomarcador dado de interés.

Los procedimientos para detectar la expresión de los biomarcadores, y opcionalmente marcadores de citocinas, dentro de las muestras biológicas de prueba y de control comprenden cualquier procedimiento que determine la cantidad o la presencia de los marcadores tanto al nivel de ácido nucleico como de proteína. Tales procedimientos son muy conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, transferencias Western, transferencias Northern, ELISA, inmunoprecipitación, inmunofluorescencia, citometría de flujo, inmunohistoquímica, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos, procedimientos de transcripción inversa de ácidos nucleicos y procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos. En ejemplos particulares, la expresión de un biomarcador se detecta a un nivel de proteína usando, por ejemplo, anticuerpos que están dirigidos contra proteínas biomarcadoras específicas. Estos anticuerpos pueden usarse en diversos procedimientos tales como transferencia Western, ELISA, tecnologías de multiplexado, inmunoprecipitación o técnicas de inmunohistoquímica. En algunos ejemplos, la detección de marcadores de citocinas se lleva a cabo por electroquimioluminiscencia (ECL). Cualquiera de estos procedimientos de detección para biomarcadores y opcionalmente marcadores de citocinas puede combinarse con la evaluación de información clínica, procedimientos de pronóstico convencionales, expresión de otros factores relacionados con CD40, particularmente expresión de CD40 y/o CD40L de la superficie celular, y niveles en circulación de CD40 soluble y/o CD40L, y expresión de, o presencia de, marcadores de pronóstico clínicamente útiles conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, aquellos observados en el presente documento anteriormente. De este modo, los procedimientos desvelados pueden permitir la determinación más precisa de sujetos candidatos cuya enfermedad autoinmunitaria o enfermedad inflamatoria se beneficiaría de la intervención terapéutica con un agente terapéutico anti-CD40 descrito en el presente documento.

Así, un sujeto candidato que tiene una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria que está asociado a células que expresan CD40 se prueba para la sensibilidad a un agente terapéutico anti-CD40 de interés usando los ensayos de pronóstico *ex vivo* descritos en el presente documento, en los que se evalúa los efectos del agente terapéutico sobre una o más actividades mediadas por CD40. Si se desea refinamiento adicional del ensayo de pronóstico *ex vivo*, el sujeto candidato puede examinarse para el nivel de expresión de, o ausencia de expresión de, uno o más factores relacionados con CD40 identificados en el presente documento anteriormente, uno o más marcadores de pronóstico clínicamente útiles, que incluyen aquellos identificados en el presente documento anteriormente, o ambos. De este modo, una muestra biológica que comprende células que expresan CD40 puede recogerse de un sujeto candidato y evaluarse para el nivel de expresión de, o ausencia de expresión de, el (los) factor(es) relacionado(s) con CD40 y/o marcador(es) de pronóstico clínicamente útil(es) de interés. Cualquier muestra biológica que comprenda células que expresan CD40 como se observa en el presente documento anteriormente pueden recogerse para estos ensayos de pronóstico. Además, cualquier procedimiento de detección conocido para aquellos expertos en la materia puede usarse para detectar el nivel de expresión, o ausencia de expresión, del (de los) factor(es) relacionado(s) con CD40 y/o marcador(es) de pronóstico clínicamente útil(es) de interés, como se observa en cualquier parte en el presente documento.

Si el nivel de expresión de uno o más factores relacionados con CD40 va a evaluarse con el fin de identificar un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria que será sensible a tratamiento con un agente terapéutico anti-CD40, una muestra biológica se recoge del sujeto, y el nivel de expresión en esa muestra se compara con el nivel de expresión de ese factor (o factores) en un control o patrón de referencia. Para el nivel de expresión de CD40 de la superficie celular y/o CD40L de la superficie celular, cualquier muestra biológica que comprenda células que expresan CD40 y/o que expresan CD40L puede usarse como se observa en el presente documento anteriormente. Para niveles en circulación de CD40s y/o CD40Ls, una muestra de sangre o muestra que comprende un componente sanguíneo tal como plasma o suero puede obtenerse del sujeto candidato. Por "control" o "patrón de referencia" está previsto un patrón que es la misma fuente biológica (es decir, tejido o fluido corporal) y que distingue sujetos que tienen la enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria de sujetos sanos que no están aquejados de la enfermedad. Un experto puede proporcionar un patrón de referencia tomando una medición de niveles de expresión de estos factores relacionados con CD40 (es decir, CD40 de la superficie celular, CD40L de la superficie celular, CD40s, CD40Ls) en sujetos sanos que no tienen la enfermedad y sujetos que tienen la enfermedad, controlando la edad, sexo, raza y similares, y comparando los niveles de expresión para determinar el nivel de expresión convencional que va a esperarse en un sujeto sano. En algunos ejemplos, el nivel de expresión en el sujeto candidato que tiene la enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria es al menos el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300% superior al nivel de expresión en el patrón de referencia. Se reconoce que la aplicabilidad de tratamiento con un agente terapéutico anti-CD40 puede evaluarse detectando el nivel de expresión de uno o más de estos factores relacionados con CD40, siendo un nivel elevado de expresión en una muestra biológica con respecto al patrón de referencia suficiente para establecer que el sujeto tiene una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria que será sensible a tratamiento con el agente terapéutico anti-CD40 de interés sin tener que hacer cribado adicional para los efectos *ex vivo* del agente terapéutico anti-CD40 sobre actividades mediadas por CD40 tales como supervivencia y proliferación celular, y/o actividad de ADCC.

En el presente documento también se desvelan kits para llevar a cabo los ensayos de pronóstico *ex vivo* de la presente invención. Por ejemplo, el kit puede comprender un compuesto marcado o agente que puede detectar un biomarcador descrito en el presente documento, por ejemplo, un biomarcador de apoptosis, proliferación o supervivencia celular, o una ruta de señalización de CD40 mediada por CD40L, tanto al nivel de proteína como de ácido nucleico, en una muestra biológica y medios para determinar la cantidad de biomarcador en la muestra (por ejemplo, un anticuerpo o una sonda de oligonucleótidos que se une a ARN que codifica un biomarcador de interés)

tras la incubación de la muestra con un agente terapéutico anti-CD40 de interés. Los kits pueden envasarse para permitir la detección de múltiples biomarcadores de interés que incluyen compuestos marcados individuales o agentes que pueden detectar cada biomarcador individual de interés y medios para determinar la cantidad de cada biomarcador en la muestra. Los kits también pueden incluir instrucciones para tratar un sujeto cuando el ensayo de pronóstico *ex vivo* genere un resultado que es indicativo de un desenlace de tratamiento positivo con el agente terapéutico anti-CD40.

Para kits basados en anticuerpos, el kit puede comprender, por ejemplo: (1) un primer anticuerpo (por ejemplo, unido a un soporte sólido) que se une a un biomarcador de interés; y, opcionalmente, (2) un segundo anticuerpo diferente que se une al biomarcador o al primer anticuerpo y está conjugado con un agente detectable. Para kits basados en oligonucleótidos, el kit puede comprender, por ejemplo: (1) un oligonucleótido, por ejemplo, un oligonucleótido detectablemente marcado que se hibrida con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el biomarcador o (2) un par de cebadores útiles para amplificar una molécula de ácido nucleico que codifica el biomarcador de interés. El kit también puede comprender, por ejemplo, un agente de tamponamiento, un conservante o un agente estabilizante de proteínas. El kit también puede comprender componentes necesarios para detectar el agente detectable (por ejemplo, una enzima o un sustrato). El kit también puede contener una muestra de control o una serie de muestras de control que pueden ensayarse y compararse con la muestra de prueba contenida. Cada componente del kit está normalmente encerrado dentro de un recipiente individual, y todos los diversos recipientes están dentro de un único envase junto con instrucciones para ver si el sujeto probado es o no un candidato para el tratamiento con el agente terapéutico anti-CD40.

#### Procedimientos de detección

Se contempla cualquier medio para identificar y cuantificar específicamente un biomarcador, marcador de citocina, o proteína de factor relacionado con CD40 de interés (por ejemplo, un biomarcador de supervivencia o proliferación celular, un biomarcador de apoptosis, un biomarcador de una ruta de señalización de CD40 mediada por CD40L, CD40 soluble en circulación o CD40L, CD40 o CD40L de la superficie celular, o un marcador de pronóstico clínicamente útil) en la muestra biológica de un sujeto candidato. Así, el nivel de expresión de una proteína biomarcadora de interés en una muestra biológica se detecta por medio de una proteína de unión que puede interactuar específicamente con esa proteína biomarcadora o una variante biológicamente activa de la misma. Preferentemente pueden usarse anticuerpos marcados, porciones de unión de los mismos, u otros componentes de unión. La palabra "marca" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto detectable o composición que está conjugado directamente o indirectamente con el anticuerpo de manera que se genere un anticuerpo "marcado". La marca puede ser detectable por sí misma (por ejemplo, marcas de radioisótopo o marcas fluorescentes) o, en el caso de una marca enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto de sustrato o composición que sea detectable. Los anticuerpos para la detección de una proteína biomarcadora pueden ser de origen monoclonal o policlonal, o pueden producirse sintéticamente o recombinantemente. La cantidad de proteína complejada, por ejemplo, la cantidad de proteína biomarcadora asociada a la proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a la proteína biomarcadora, se determina usando metodologías de detección de proteínas convencionales conocidas para aquellos expertos en la materia. Una revisión detallada del diseño de ensayos inmunológicos, teoría y protocolos puede encontrarse en numerosos textos en la materia (véase, por ejemplo, Ausubel y col., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*) (Greene Publishing y Wiley-Interscience, NY)); Coligan y col., eds. (1994) *Current Protocols in Immunology* (John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY).

Está disponible una variedad de ensayos para detectar proteínas con anticuerpos marcados. En un ensayo de una etapa, la proteína diana de interés que va a detectarse, si está presente, se inmoviliza e incuba con un anticuerpo marcado. El anticuerpo marcado se une a la molécula de proteína diana inmovilizada. Después de lavar para eliminar las moléculas sin unir, la muestra se ensaya para la presencia de la marca. En un formato convencional, una única proteína se ensaya por muestra. Usando las tecnologías de multiplex más nuevas pueden ensayarse múltiples proteínas en una única muestra usando diferentes marcas para cada anticuerpo en detección.

En un ensayo de dos etapas, la molécula de proteína diana inmovilizada de interés se incuba con un anticuerpo sin marcar. El complejo proteína diana-anticuerpo sin marcar, si está presente, se une entonces a un segundo anticuerpo marcado que es específico para el anticuerpo sin marcar. La muestra se lava y se ensaya para la presencia de la marca.

La elección del marcador usado para marcar los anticuerpos variará dependiendo de la aplicación. Sin embargo, la elección del marcador es fácilmente determinable para un experto en la materia. Estos anticuerpos marcados pueden usarse en inmunoensayos, además de en aplicaciones histológicas para detectar la presencia de cualquier biomarcador o proteína de interés. Los anticuerpos marcados pueden ser policlonales o monoclonales. Además, los anticuerpos para su uso en detectar una proteína de interés pueden marcarse con un átomo radiactivo, una enzima, un resto cromóforo o fluorescente, o una marca colorimétrica como se describe en cualquier parte en el presente documento. La elección del marcador de marcado también dependerá de las limitaciones de detección deseadas. Los ensayos de enzimas (ELISA) normalmente permiten la detección de un producto coloreado formado por interacción del complejo marcado con enzima con un sustrato enzimático. Radionúclidos que pueden servir de

marcas detectables incluyen, por ejemplo, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212 y Pd-109. Ejemplos de enzimas que pueden servir de marcas detectables incluyen, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Los restos cromóforos incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína y rodamina. Los anticuerpos pueden conjugarse con estas marcas mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las enzimas y moléculas cromóforas pueden conjugarse con los anticuerpos por medio de agentes de acoplamiento, tales como dialdehídos, carbodiimidas, dimaleimidas y similares. Alternativamente, la conjugación puede producirse mediante un par ligando-receptor. Ejemplos de pares ligando-receptor adecuados son biotina-avidina o biotina-estreptavidina, y anticuerpo-antígeno.

En algunos ejemplos, la presente divulgación contempla el uso de una técnica de sándwich para detectar uno o más biomarcadores, u otras proteínas de interés como se observa en el presente documento anteriormente, en suero y otros fluidos biológicos. Como se describe en la publicación internacional nº WO 93/09437, una técnica tal usa dos anticuerpos que pueden unirse a la proteína de interés: por ejemplo, una de las cuales está libre en disolución, pero marcada con un compuesto químico detectable, la otra de las cuales se inmoviliza sobre un soporte sólido. Ejemplos de marcas químicas que pueden usarse para el segundo anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, radioisótopos, compuestos fluorescentes y enzimas, u otras moléculas que generan productos coloreados o electroquímicamente activos cuando se exponen a un reactante o sustrato enzimático. Cuando las muestras que contienen el biomarcador u otras proteína de interés se colocan en este sistema, el biomarcador u otra proteína de interés se une a tanto el anticuerpo inmovilizado como al anticuerpo marcado. El resultado es un complejo inmunitario de "sándwich" inmune sobre la superficie del soporte. La proteína complejada se detecta lavando los componentes de la muestra sin unir y el anticuerpo marcado en exceso, y midiendo la cantidad de anticuerpo marcado complejada con la proteína sobre la superficie del soporte. El inmunoensayo de sándwich es altamente específico y muy sensible, a condición de que se usen marcas con buenos límites de detección.

Las muestras biológicas pueden cribarse individualmente; alternativamente, numerosas muestras de fluidos biológicos pueden cribarse al mismo tiempo, por ejemplo, usando el formato de microtitulación de 96 pocillos convencional, que se usa ampliamente y es fácilmente automatizable. También hay varios espectrómetros comercialmente disponibles ("lectores de placas") para analizar calorimétricamente placas de 96 pocillos. Además, las muestras biológicas pueden cribarse para un biomarcador, o múltiples marcadores, por ejemplo, un panel de biomarcadores, usando procedimientos muy conocidos en la técnica.

En ejemplos preferidos, la expresión de uno o más biomarcadores u otras proteínas de interés dentro de una muestra biológica, por ejemplo, una muestra de fluido corporal, se detecta por radioinmunoensayos o inmunoensayos ligados a enzima (ELISA), inmunoensayos ligados a enzima de unión competitiva, transferencia puntual (véase, por ejemplo, Promega Protocols and Applications Guide (2ª ed.; Promega Corporation (1991), transferencia Western (véase, por ejemplo, Sambrook y col. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, vol. 3, Capítulo 18 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY), cromatografía, preferentemente cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), u otros ensayos conocidos en la técnica. Así, los ensayos de detección pueden implicar etapas tales como, pero no se limitan a, inmunotransferencia, inmunodifusión, inmunoelectroforesis o inmunoprecipitación.

Para cualquier ensayo de detección de proteínas dado, la muestra biológica, o una submuestra de la misma que comprende células que expresan CD40, se pone en contacto con el componente de unión, por ejemplo, el anticuerpo, o anticuerpo detectablemente marcado, para el biomarcador u otra proteína de interés, durante un tiempo suficiente para permitir la formación de complejos anticuerpo-antígeno, y luego se detecta la unión del anticuerpo, por ejemplo, mediante cualquier medio observado en el presente documento anteriormente. Los anticuerpos y anticuerpos detectablemente marcados para los biomarcadores, factores relacionados con CD40 y marcadores de pronóstico clínicamente útiles descritos en el presente documento son muy conocidos en la técnica y comercialmente disponibles. Véanse, por ejemplo, anticuerpos específicos para biomarcadores de apoptosis, supervivencia celular y rutas de señalización de CD40, además de marcadores de pronóstico clínicamente útiles disponibles, por ejemplo, de Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts; DAKO, Copenhague, Dinamarca; y similares. Alternativamente, los anticuerpos, o formas detectablemente marcadas de estos anticuerpos, pueden generarse usando procedimientos de producción de anticuerpos muy conocidos en la técnica, y adicionalmente descritos en el presente documento más adelante.

Están comercialmente disponibles varios kits de ensayo para biomarcadores de caspasas. Por ejemplo, el ensayo de caspasas homogéneas (Roche Applied Sciences, Indianápolis, Indiana), es un ensayo fluorimétrico para la determinación *in vitro* cuantitativa de la actividad de caspasa en microplacas. El ensayo es particularmente útil para el cribado de alta resolución permitiendo, por ejemplo, 100 pruebas sobre placas de 96 pocillos y 400 pruebas sobre placas de 384 pocillos (nº de cat. 3 005 372). Este ensayo permite la detección de varias caspasas, que incluyen caspasa-2, caspasa-3, caspasa-7, y a un menor grado, caspasa-6, caspasa-8, caspasa-9 y caspasa-10, en muestras biológicas, que incluyen, por ejemplo, suero o plasma. El ensayo ELISA<sup>PLUS</sup> de detección de muerte celular (nº de cat. 1 774 425; Roche Applied Sciences, Indianápolis, Indiana) se basa en un principio de inmunoensayo enzimático de sándwich cuantitativo que usa anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra ADN e histonas, respectivamente. Este ensayo permite la detección y cuantificación específica de mono- y oligonucleosomas que son liberadas en el citoplasma de células que mueren de apoptosis. Puede usarse para una variedad de muestras, que

incluyen lisados celulares, suero, sobrenadante de cultivo y similares.

La PS de la superficie celular puede detectarse usando cualquiera de los reactivos de tinción de anexina V comercialmente disponibles, que se basan en la alta afinidad de la anexina V por PS. Véase, por ejemplo, los reactivos de tinción de anexina V comercialmente disponibles de Roche Applied Science. Conjugando FITC con anexina V es posible identificar y cuantificar células apoptóticas basándose en una única célula por citometría de flujo. La tinción de células simultáneamente con FITC-anexina V (fluorescencia verde) y el colorante no vital yoduro de propidio (fluorescencia roja) puede proporcionar la discriminación de células intactas (FITC-PI-), células apoptóticas tempranas (FITC+PI-) y apoptóticas tardías o necróticas (FITC+PI+).

Además, la elevada apoptosis dentro de una muestra biológica puede confirmarse con procedimientos basados en ácidos nucleicos que detectan la fragmentación de ADN que es característica de apoptosis. Cuando se resuelve usando electroforesis sobre geles de agarosa, el ADN apoptótico inicialmente tiene un patrón de "fragmentación" característico, a diferencia de una mancha de ácidos nucleicos que se observa, por ejemplo, en necrosis u otra degradación de ADN no específica. Una técnica histoquímica común para detectar fragmentación de ADN usa ADN marcado en el extremo. Los kits para esto están comercialmente disponibles, tales como el kit de fragmentación de ADN APOPERT (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, California). Este ensayo se basa en marcado de extremos cortados por dUTP mediado por desoxinucleotidiltransferasa terminal (Tdt) (TUNEL), en la que Tdt cataliza la incorporación de fluoresceína-dUTP en los extremos de hidroxilo 3' libres de ADN fragmentado en células que experimentan apoptosis.

Cualquier procedimiento conocido en la técnica puede usarse para detectar la producción de marcadores de citocinas. Ensayos convencionales comprenden un formato de ELISA en el que una citocina se mide por muestra. Alternativamente, una tecnología más sensible es electroquimioluminiscencia (ECL). En una realización, la producción de citocinas se ensaya usando ECL, por ejemplo, usando un sistema de múltiples matrices tal como el sistema Meso Scale Discovery® comercialmente disponible para ensayos de citocinas de alto rendimiento (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Mariland). Otros formatos que permiten medir múltiples citocinas (u otros analitos) de una vez dentro de una muestra incluyen las tecnologías de múltiplex. Un producto tal es la tecnología de perlas Luminex® (Luminex Corporation, Austin, Texas), en la que hasta 100 microesferas codificadas por color recubiertas con reactivos específicos para un bioensayo particular (tal como un anticuerpo para una citocina) pueden mezclarse juntas y analizarse usando tecnología láser.

La presencia de uno o más de los biomarcadores, citocinas, factores relacionados con CD40 y marcadores de pronóstico clínicamente útiles descritos en el presente documento dentro de una muestra biológica obtenida de un sujeto candidato también puede determinarse al nivel de ácido nucleico. Las técnicas basadas en ácidos nucleicos para evaluar la expresión son muy conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, determinar el nivel de ARNm de biomarcador en una muestra biológica. Muchos procedimientos de detección de la expresión usan ARN aislado. Cualquier técnica de aislamiento de ARN que no seleccione en contra del aislamiento de ARNm puede utilizarse para la purificación de ARN (véase, por ejemplo, Ausubel y col., ed. (1987-1999) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Nueva York). Adicionalmente, grandes números de muestras de tejido pueden procesarse fácilmente usando técnicas muy conocidas para aquellos expertos en la materia tales como, por ejemplo, el procedimiento de aislamiento de ARN de una sola etapa desvelado en la patente de EE.UU. nº 4.843.155.

Así, en algunos ejemplos, la detección de un biomarcador u otra proteína de interés se ensaya al nivel de ácido nucleico usando sondas de ácido nucleico. El término "sonda de ácido nucleico" se refiere a cualquier molécula que pueda unirse selectivamente a una molécula de ácido nucleico diana específicamente prevista, por ejemplo, un transcrito de nucleótido. Las sondas pueden sintetizarse por un experto en la materia, o derivarse de preparaciones biológicas apropiadas. Las sondas pueden diseñarse específicamente para marcarse, por ejemplo, con una marca radiactiva, una marca fluorescente, una enzima, una marca quimioluminiscente, una marca colorimétrica u otras marcas que se tratan anteriormente o que se conocen en la técnica. Ejemplos de moléculas que pueden utilizarse como sondas incluyen, pero no se limitan a, ARN y ADN.

Por ejemplo, puede usarse ARNm aislado en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, pero no se limitan a, análisis Southern o Northern, análisis de reacción en cadena de la polimerasa y matrices de sondas. Un procedimiento para la detección de niveles de ARNm implica poner en contacto el ARNm aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que puede hibridarse con el ARNm codificado por el gen que se detecta. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ADNc de longitud completa, o una parte del mismo, tal como un oligonucleótido de al menos 7, 15, 30, 50, 100, 250 ó 500 nucleótidos en longitud y suficiente para hibridarse específicamente bajo condiciones rigurosas con un ARNm o ADN genómico que codifica un biomarcador, factor relacionado con CD40 o marcador de pronóstico clínicamente útil descrito en el presente documento anteriormente. La hibridación de un ARNm con la sonda indica que el biomarcador u otra proteína diana de interés está siendo expresada.

En un ejemplo, el ARNm se inmoviliza sobre una superficie sólida y se pone en contacto con una sonda, por ejemplo, haciendo correr el ARNm aislado sobre un gel de agarosa y transfiriendo el ARNm del gel a una membrana, tal como nitrocelulosa. En una realización alternativa, la(s) sonda(s) se inmoviliza(n) sobre una superficie sólida y el

ARNm se pone en contacto con la(s) sonda(s), por ejemplo, en una matriz de chip de gen. Un experto puede adaptar fácilmente procedimientos de detección de ARNm conocidos para su uso en detectar el nivel de ARNm que codifica los biomarcadores u otras proteínas de interés.

5 Un procedimiento alternativo para determinar el nivel de un ARNm de interés en una muestra implica el procedimiento de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, por RT-PCR (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.683.202), reacción en cadena de la ligasa (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193), replicación de secuencias autosostenidas (Guatelli y col. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh y col. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177), Q-beta replicasa (Lizardi y col. (1988) Bio/Technology 6:1197), replicación por círculo rodante (patente de EE.UU. nº 5.854.033) o  
10 cualquier otro procedimiento de amplificación de ácido nucleico, seguido de la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas muy conocidas para aquellos expertos en la materia. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácidos nucleicos si tales moléculas están presentes en números muy bajos. En aspectos particulares de la invención, la expresión de biomarcadores, o expresión de un factor relacionado con CD40 u otro marcador de pronóstico clínicamente útil, se evalúa por RT-PCR fluorogénica  
15 cuantitativa (es decir, el sistema TaqMan®).

Los niveles de expresión de un ARN de interés pueden monitorizarse usando una transferencia en membrana (tal como se usa en análisis de hibridación tal como Northern, puntual, y similares), o micropocillos, tubos de muestra, geles, perlas o fibras (o cualquier soporte sólido que comprenda ácidos nucleicos unidos). Véanse las  
20 patentes de EE.UU. nº 5.770.722, 5.874.219, 5.744.305, 5.677.195 y 5.445.934. La detección de la expresión también puede comprender usar sondas de ácido nucleico en disolución.

En un ejemplo se usan micromatrices para detectar la expresión de uno o más biomarcadores, factores relacionados con CD40 y/o marcadores de pronóstico clínicamente útiles. Las micromatrices son particularmente  
25 muy adecuadas para este fin debido a la reproducibilidad entre diferentes experimentos. Las micromatrices de ADN proporcionan un procedimiento para la medición simultánea de niveles de expresión de grandes números de genes. Cada matriz consiste en un patrón reproducible de sondas de captura unidas a un soporte sólido. El ARN o ADN marcado se hibrida con sondas complementarias sobre la matriz y luego se detecta por barrido láser. Las intensidades de hibridación para cada sonda sobre la matriz se determinan y se convierten en un valor cuantitativo  
30 que representa niveles relativos de expresión génica. Véanse las patentes de EE.UU. nº 6.040.138, 5.800.992 y 6.020.135, 6.033.860 y 6.344.316. Las matrices de oligonucleótidos de alta densidad son particularmente útiles para determinar el perfil de expresión génica para un gran número de ARN en una muestra.

Técnicas para la síntesis de estas matrices usando procedimientos de síntesis mecánicos se describen en, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.384.261. Aunque se prefiere una superficie de matriz plana, la matriz puede fabricarse sobre una superficie de prácticamente cualquier forma o incluso una multiplicidad de superficies. Las matrices pueden ser péptidos o ácidos nucleicos sobre perlas, geles, superficies poliméricas, fibras tales como fibras ópticas, vidrio o cualquier otro sustrato apropiado, véanse las patentes de EE.UU. nº 5.770.358, 5.789.162,  
40 5.708.153, 6.040.193 y 5.800.992. Las matrices pueden envasarse de tal manera que se permitan diagnósticos u otra manipulación de un dispositivo todo incluido. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.856.174 y 5.922.591.

En un enfoque, el ARNm total aislado de la muestra se convierte en ARNc marcado y luego se hibrida con una matriz de oligonucleótidos. Cada muestra se hibrida con una matriz separada. Los niveles relativos de transcrito  
45 pueden calcularse por referencia a controles apropiados presentes sobre la matriz y en la muestra.

#### Agentes terapéuticos anti-CD40

Los ensayos de pronóstico *ex vivo* descritos en el presente documento pueden usarse para identificar sujetos  
50 que tienen una enfermedad inflamatoria y/o enfermedad autoinmunitaria asociada a células que expresan CD40 que se beneficiarían del tratamiento con cualquier agente terapéutico anti-CD40 de interés. De particular interés son agentes terapéuticos anti-CD40 que modulan la señalización de CD40 mediada por CD40L y/o modulan ADCC. Tales agentes terapéuticos anti-CD40 incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-CD40 antagonistas que bloquean o interfieren con la señalización mediada por CD40L y/o modulan la actividad de ADCC cuando se unen a  
55 CD40, antagonistas de CD40L, que incluyen anticuerpos anti-CD40L, formas mutadas de CD40L que pueden unirse a CD40, pero que provocan la señalización de CD40, CD40 soluble, formas solubles de proteínas de fusión que comprenden CD40 y agentes farmacológicos que alteran o interfieren la interacción de CD40L-CD40 y/o interfieren con la señalización de CD40, por ejemplo, los compuestos interruptores de la unión CD40:CD40L desvelados en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 20040067982. De particular interés son agentes terapéuticos anti-  
60 CD40 antagonistas, por ejemplo, anticuerpos anti-CD40 antagonistas y anticuerpos anti-CD40L antagonistas, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que sirven para bloquear la señalización de CD40 mediada por CD40L, y agentes terapéuticos anti-CD40 que modulan ADCC, por ejemplo, anticuerpos anti-CD40 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

65 *Anticuerpos anti-CD40*

Los anticuerpos monoclonales para CD40 se conocen en la técnica. Véanse, por ejemplo, las secciones dedicadas a antígeno de linfocitos B en McMichael, ed. (1987; 1989) *Leukocyte Typing III and IV* (Oxford University Press, Nueva York); patentes de EE.UU. n° 5.674.492; 5.874.082; 5.677.165; 6.056.959; documento WO 00/63395; publicaciones internacionales n° WO 02/28905 y WO 02/28904; Gordon y col. (1988) *J. Immunol.* 140:1425; Valle y col. (1989) *Eur. J. Immunol.* 19:1463; Clark y col. (1986) *PNAS* 83:4494; Paulie y col. (1989) *J. Immunol.* 142:590; Gordon y col. (1987) *Eur. J. Immunol.* 17:1535; Jabara y col. (1990) *J. Exp. Med.* 172:1861; Zhang y col. (1991) *J. Immunol.* 146:1836; Gascan y col. (1991) *J. Immunol.* 147:8; Banchereau y col. (1991) *Clin. Immuno. Spectrum* 3:8; y Banchereau y col. (1991) *Science* 251:70. Otros anticuerpos monoclonales anti-CD40 incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-CD40 humanizados tales como SGN-40 (Tai y col. (2004) *Cancer Res.* 64:2846-52; patente de EE.UU. n° 6.838.261), que es la forma humanizada del anticuerpo anti-CD40 murino SGN-14 (Francisco y col. (2000) *Cancer Res.* 60:3225-31), y los anticuerpos agonistas y antagonistas desvelados en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 2004/0120948.

En un ejemplo, los ensayos de pronóstico *ex vivo* se usan para examinar la idoneidad o eficacia de tratamiento con anticuerpos anti-CD40 antagonistas. Los anticuerpos anti-CD40 antagonistas para su uso en los procedimientos incluyen anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que pueden unirse específicamente a antígeno CD40 humano expresado sobre la superficie de una célula humana. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD40 antagonistas para su uso en los procedimientos de la presente invención presentan una fuerte afinidad de unión por un único sitio para el antígeno de la superficie celular de CD40. Tales anticuerpos monoclonales presentan una constante de equilibrio de disociación ( $K_D$ ) para CD40 de al menos  $10^{-5}$  M, al menos  $3 \times 10^{-5}$  M, preferentemente al menos  $10^{-6}$  M a  $10^{-7}$  M, más preferentemente al menos  $10^{-8}$  M a aproximadamente  $10^{-12}$  M, medida usando un ensayo convencional tal como Biacore™. El análisis Biacore se conoce en la técnica y se proporcionan detalles en "BIAApplications handbook". Los procedimientos descritos en el documento WO 01/27160 pueden usarse para modular la afinidad de unión.

Son de particular interés anticuerpos anti-CD40 antagonistas que están libres de actividad antagonista significativa como se define en el presente documento anteriormente, pero presentan actividad antagonista cuando se unen a antígeno CD40 sobre células humanas. En una realización de la invención, el anticuerpo anti-CD40 antagonista está libre de actividad antagonista significativa en una respuesta de linfocitos B. En otro ejemplo, el anticuerpo anti-CD40 antagonista está libre de actividad antagonista significativa en ensayos de más de una respuesta de linfocitos B (por ejemplo, proliferación y diferenciación, o proliferación, diferenciación y producción de anticuerpos). Anticuerpos monoclonales anti-CD40 adecuados tienen regiones constantes humanas; preferentemente también tienen regiones estructurales completamente o parcialmente humanizadas; y lo más preferentemente son anticuerpos completamente humanos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Ejemplos de tales anticuerpos monoclonales son los anticuerpos designados en el presente documento CHIR-5.9 y CHIR-12.12.

Los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 representan anticuerpos anti-CD40 antagonistas para su uso en los procedimientos de la presente divulgación. Los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 son anticuerpos monoclonales anti-CD40 completamente humanos del isotipo IgG<sub>1</sub> producidos a partir de las líneas celulares de hibridoma 131.2F8.5.9 (denominada en el presente documento la línea celular 5.9) y 153.8E2.D10.D6.12.12 (denominada en el presente documento la línea celular 12.12). Estas líneas celulares se crearon usando esplenocitos de ratones xenotípicos inmunizados que contienen el locus de la cadena pesada de IgG<sub>1</sub> humana y el locus de la cadena  $\kappa$  humana (tecnología XenoMouse®; Abgenix; Fremont, California). Las células del bazo se fusionaron con las células SP2/0 de mieloma de ratón (Sierra BioSource). Los hibridomas resultantes se subclonaron varias veces para crear las líneas celulares monoclonales estables 5.9 y 12.12. Otros anticuerpos de la invención pueden prepararse similarmente usando ratones transgénicos para loci de inmunoglobulina humana o por otros procedimientos conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento.

Se desvelan secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las regiones variables del anticuerpo CHIR-12.12 y las secuencias de aminoácidos de las regiones variables del anticuerpo CHIR-5.9. Más particularmente, las secuencias de aminoácidos para las regiones conductoras, variables y constantes para la cadena ligera y cadena pesada para mAb CHIR-12.12 se exponen en SEC ID N°: 2 (secuencia completa para la cadena ligera de mAb CHIR-12.12), SEC ID N°: 4 (secuencia completa para la cadena pesada para mAb CHIR-12.12) y SEC ID N°: 5 (secuencia completa para una variante de la cadena pesada para mAb CHIR-12.12 expuesta en SEC ID N°: 4, en la que la variante comprende una sustitución de serina por el residuo de alanina en la posición 153 de SEC ID N°: 4). Las secuencias de nucleótidos que codifican la cadena ligera y cadena pesada para mAb CHIR-12.12 se exponen en SEC ID N°: 1 (secuencia codificante para la cadena ligera para mAb CHIR-12.12) y SEC ID N°: 3 (secuencia codificante para la cadena pesada para mAb CHIR-12.12). Las secuencias de aminoácidos para las regiones conductoras, variables y constantes para la cadena ligera y cadena pesada del mAb CHIR-5.9 se exponen en SEC ID N°: 6 (secuencia completa para la cadena ligera de mAb CHIR-5.9), SEC ID N°: 7 (secuencia completa para la cadena pesada de mAb CHIR-5.9) y SEC ID N°: 8 (la secuencia completa para una variante de la cadena pesada de mAb CHIR-5.9 se expone en SEC ID N°: 7, en la que la variante comprende una sustitución de serina por el residuo de alanina en la posición 158 de SEC ID N°: 7). Además, se han depositado hibridomas que expresan los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 en la ATCC con una designación de depósito de patente de PTA-5542 y PTA-5543, respectivamente.

Además de la actividad antagonista, los anticuerpos anti-CD40 para su uso en los procedimientos de la presente divulgación pueden tener otro mecanismo de acción contra una célula tumoral. Por ejemplo, anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 nativos tienen actividad de ADCC. Alternativamente, las regiones variables de los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 pueden expresarse sobre otro isotipo de anticuerpo que tiene actividad de ADCC. También es posible conjugar formas nativas, formas recombinantes o fragmentos de unión a antígeno de CHIR-5.9 o CHIR-12.12 a una citotoxina, un agente terapéutico o un ión metálico radiactivo o radioisótopo, como se observa en el presente documento más adelante.

Los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 se unen a CD40 soluble en ensayos de tipo ELISA, previenen la unión de ligando de CD40 a CD40 de la superficie celular y desplazan el ligando de CD40 previamente unido, como se ha determinado por ensayos de citometría de flujo. Los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 compiten entre sí para unirse a CD40, pero no a 15B8, el anticuerpo monoclonal dirigido contra CD40 descrito en la solicitud internacional PCT n° PCT1US01/30857 publicada como WO 02/28904 titulada "Anticuerpos anti-CD40 humanos" presentada el 2 de octubre de 2001 (expediente de agente n° PP16092.003). Cuando se prueban *in vitro* para efectos sobre la proliferación de linfocitos B de sujetos humanos normales, CHIR-5.9 y CHIR-12.12 actúan de anticuerpos anti-CD40 antagonistas. Además, CHIR-5.9 y CHIR-12.12 no inducen una fuerte proliferación de linfocitos humanos de sujetos normales. Estos anticuerpos pueden destruir células que expresan CD40 diana por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). La afinidad de unión de CHIR-5.9 por CD40 humana es  $1,2 \times 10^{-8}$  M y la afinidad de unión de CHIR-12.12 es  $5 \times 10^{-10}$  M, como se ha determinado por el ensayo Biacore™.

Otros anticuerpos anti-CD40 antagonistas que comparten las características de unión de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos anteriormente incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: (1) los anticuerpos monoclonales producidos por las líneas celulares de hibridoma designadas 131.2F8.5.9 (denominada en el presente documento la línea celular 5.9) y 153.8E2.D10.D6.12.12 (denominada en el presente documento la línea celular 12.12), depositadas en la ATCC como el depósito de patente n° PTA-5542 y el depósito de patente n° PTA-5543, respectivamente; (2) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia mostrada en SEC ID N°: 2, la secuencia mostrada en SEC ID N°: 4, la secuencia mostrada en SEC ID N°: 5, tanto las secuencias mostradas en SEC ID N°: 2 como SEC ID N°: 4, y tanto las secuencias mostradas en SEC ID N°: 2 como SEC ID N°: 5; (3) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia mostrada en SEC ID N°: 6, la secuencia mostrada en SEC ID N°: 7, la secuencia mostrada en SEC ID N°: 8, tanto las secuencias mostradas en SEC ID N°: 6 como SEC ID N°: 7, y tanto las secuencias mostradas en SEC ID N°: 6 como SEC ID N°: 8; (4) un anticuerpo monoclonal que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID N°: 1, la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID N°: 3 y tanto las secuencias mostradas en SEC ID N°: 1 como SEC ID N°: 3; (5) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que puede unirse al anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 5.9 o la línea celular de hibridoma 12.12; (6) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 12; (7) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitiva; y (8) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 o los anteriores anticuerpos monoclonales en los puntos (1)-(7) precedentes, en los que el fragmento retiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno CD40 humano.

Aquellos expertos en la materia reconocen que los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de estos anticuerpos descritos en el presente documento incluyen anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se producen recombinantemente usando procedimientos muy conocidos en la técnica y descritos en el presente documento más adelante, e incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 que se han producido recombinantemente.

Anticuerpos anti-CD40 antagonistas adicionales incluyen los anticuerpos monoclonales denominados 5D12, 3A8 y 3C6, que son secretados por un hibridoma que tiene números de accesos de ATCC HB 11339, HB 12024 y HB 11340, respectivamente. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 6.315.998.

Otros anticuerpos anti-CD40 antagonistas se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, el anticuerpo anti-CD40 humano producido por el hibridoma designado F4-465 desvelado en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n° 20020142358 y 20030059427. F4-465 se obtuvo de ratón HAC (Kuroiwa y col. (2000) Nature Biotech. 10:1086 (2000)) y por tanto expresa la cadena ligera lambda humana.

#### *Anticuerpos anti-CD40L antagonistas.*

Los anticuerpos que se unen a CD40L y así interfieren con la interacción CD40/CD40L o señalización de CD40 mediada por CD40L se conocen en la técnica. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, los desvelados en la publicación de patente internacional WO 95/06666. Ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-CD40L antagonistas designados 89-76 y 24-31, que se producen por los hibridomas 89-76 y 24-31,

respectivamente, depositados en la Colección americana de cultivos tipo (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209, y asignados al número de acceso de ATCC HB 11713 y HB 11712, respectivamente.

#### Producción de anticuerpos

5

Los anticuerpos, por ejemplo, los anticuerpos anti-CD40 antagonistas desvelados en el presente documento y cualquier anticuerpo que se une específicamente a un biomarcador u otro marcador de pronóstico clínicamente útil de interés, pueden producirse usando cualquier procedimiento de producción de anticuerpos conocido para aquellos expertos en la materia. Así, pueden prepararse sueros policlonales mediante procedimientos convencionales. En general, una disolución que contiene el antígeno de interés, por ejemplo, el antígeno CD40 o antígeno CD40L, se usa primero para inmunizar un animal adecuado, preferentemente un ratón, rata, conejo o cabra. Se prefieren conejos o cabras para la preparación de sueros policlonales debido al volumen de suero obtenible, y la disponibilidad de anticuerpos anti-conejo y anti-cabra marcados.

10

15

Los sueros policlonales pueden prepararse en un animal transgénico, preferentemente un ratón que lleva loci de inmunoglobulina humana. En una realización preferida, células Sf9 que expresan la proteína de interés, por ejemplo, CD40 o CD40L, se usan como inmunógeno. La inmunización también puede realizarse mezclando o emulsionando la disolución que contiene antígeno en solución salina, preferentemente en un adyuvante tal como adyuvante completo de Freund, e inyectando la mezcla o emulsión parenteralmente (generalmente subcutáneamente o intramuscularmente). Una dosis de 50-200 µg/inyección es normalmente suficiente. La inmunización se refuerza generalmente 2-6 semanas después con una o más inyecciones de la proteína en solución salina, preferentemente usando adyuvante incompleto de Freund. Alternativamente pueden generarse anticuerpos por inmunización *in vitro* usando procedimientos conocidos en la técnica, que para los fines de la presente invención se consideran equivalentes a inmunización *in vivo*. Los antisueros policlonales se obtienen sangrando el animal inmunizado en un recipiente de vidrio o plástico, incubando la sangre a 25 °C durante una hora, seguido de incubando a 4 °C durante 2-18 horas. El suero se recupera por centrifugación (por ejemplo, 1.000 x g durante 10 minutos). Pueden obtenerse aproximadamente 20-50 ml por sangrado de conejos.

20

25

La producción de células Sf 9 (*Spodoptera frugiperda*) se desvela en la patente de EE.UU. nº 6.004.552. En el caso de CD40, brevemente, secuencias que codifican CD40 humana se recombinaron en un baculovirus usando vectores de transferencia. Los plásmidos se co-transfectaron con ADN de baculovirus natural en células Sf 9. Las células Sf 9 infectadas por baculovirus recombinantes se identificaron y se purificaron clonalmente.

30

35

Preferentemente, el anticuerpo es monoclonal en la naturaleza. Por "anticuerpo monoclonal" está previsto un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. El término no se limita considerando las especies o fuente del anticuerpo. El término engloba inmunoglobulinas completas, además de fragmentos tales como Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv y otros que retienen la función de unión a antígeno del anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico; por ejemplo, en el caso de anticuerpos anti-CD40 o anticuerpos anti-CD40L, el antígeno de la superficie celular CD40 o el antígeno de la superficie celular CD40L, respectivamente. Además, a diferencia de preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se ha obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiera la producción del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse según la presente invención pueden prepararse mediante el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col. (1975) Nature 256:495, o pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fago usando las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson y col. (1991) Nature 352:624-628; Marks y col. (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597; y la patente de EE.UU. nº 5.514.548.

40

45

50

55

Por "epítipo" está prevista la parte de una molécula antigénica con la que un anticuerpo se produce y con la que el anticuerpo se unirá. Los epítipes pueden comprender residuos de aminoácidos lineales (es decir, los residuos dentro del epítipo están dispuestos secuencialmente uno después del otro en una forma lineal), residuos de aminoácidos no lineales (denominados en el presente documento "epítipes no lineales"; estos epítipes no están dispuestos secuencialmente), o residuos de aminoácidos tanto lineales como no lineales.

60

65

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando el procedimiento de Kohler y col. (1975) Nature 256:495-496, o una modificación del mismo. Normalmente, un ratón se inmuniza con una disolución que contiene un antígeno. La inmunización puede realizarse mezclando o emulsionando la disolución que contiene antígeno en solución salina, preferentemente en un adyuvante tal como adyuvante completo de Freund, e inyectando la mezcla o emulsión parenteralmente. Cualquier procedimiento de inmunización conocido en la técnica puede usarse para obtener los anticuerpos monoclonales de la invención. Después de la inmunización del animal, el bazo (y opcionalmente, varios ganglios linfáticos grandes) se extirpan y se disocian en células individuales. Las células del

bazo pueden cribarse aplicando una suspensión de células a una placa o pocillo recubierto con el antígeno de interés. Los linfocitos B que expresan inmunoglobulina unida a la membrana específica para el antígeno se unen a la placa y no se lavan. Los linfocitos B resultantes, o todas las células del bazo disociadas, se inducen entonces para fusionarse con células de mieloma para formar hibridomas, y se cultivan en un medio selectivo. Las células resultantes se siembran en placa por dilución seriada y se ensayan para la producción de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno de interés (y que no se unen a antígenos sin relacionar). Los hibridomas que secretan el anticuerpo monoclonal (mAb) seleccionado se cultivan entonces tanto *in vitro* (por ejemplo, en botellas de cultivo de tejido o reactores de fibra hueca) como *in vivo* (como ascitis en ratones).

Si los anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos anti-CD40 antagonistas o anticuerpos anti-CD40L antagonistas, van a prepararse usando procedimientos de ADN recombinante, el ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma descritas en el presente documento sirven de fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que luego se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otro modo proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifican el anticuerpo incluyen Skerra y col. (1993) *Curr. Opin. Immunol.* 5:256 y Phickthun (1992) *Immunol. Revs.* 130:151. Alternativamente, el anticuerpo puede producirse en una línea celular tal como una línea celular CHO, como se ha desvelado en las patentes de EE.UU. nº 5.545.403; 5.545.405; y 5.998.144. Brevemente, la línea celular se transfecta con vectores que pueden expresar una cadena ligera y una cadena pesada, respectivamente. Transfectando las dos proteínas en vectores separados pueden producirse anticuerpos quiméricos. Otra ventaja es la correcta glucosilación del anticuerpo.

El anticuerpo anti-CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se produce en células CHO usando el sistema de expresión en genes GS (Lonza Biologics, Portsmouth, New Hampshire), que usa glutamina sintetasa como marcador. Véanse también las patentes de EE.UU. nº 5.122.464; 5.591.639; 5.658.759; 5.770.359; 5.827.739; 5.879.936; 5.891.693; y 5.981.216.

Adicionalmente, los anticuerpos pueden ser anticuerpos quiméricos que tienen las características de unión deseadas. Así, por ejemplo, anticuerpos anti-CD40 quiméricos podrían tener las características de unión de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos en el presente documento. Por anticuerpos "quiméricos" está previsto anticuerpos que se derivan lo más preferentemente usando técnicas de ácido desoxirribonucleico recombinante y que comprenden tanto componentes humanos (incluyendo especies inmunológicamente "relacionadas", por ejemplo, chimpancé) como no humanos. Así, la región constante del anticuerpo quimérico es lo más preferentemente sustancialmente idéntica a la región constante de un anticuerpo humano natural; la región variable del anticuerpo quimérico se deriva lo más preferentemente de una fuente no humana y tiene la especificidad antigénica deseada por el antígeno de interés, por ejemplo, antígeno CD40 o CD40L. La fuente no humana puede ser cualquier fuente de vertebrado que pueda usarse para generar anticuerpos para un antígeno humano o material que comprende un antígeno CD40 humano. Tales fuentes no humanas incluyen, pero no se limitan a, roedores (por ejemplo, conejo, rata, ratón, etc.; véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.816.567 y primates no humanos (por ejemplo, mono del viejo mundo, simio superior, etc.; véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.750.105 y 5.756.096). Como se usa en el presente documento, el término "inmunológicamente activo" cuando se usa en referencia, por ejemplo, a anticuerpos anti-CD40 quiméricos o anticuerpos anti-CD40L quiméricos, significa un anticuerpo quimérico que se une a CD40 humana o CD40L humana, respectivamente.

Por "humanizado" está previsto formas de anticuerpos que contienen secuencia mínima derivada de secuencias de inmunoglobulina no humana. En general, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que residuos de una región hipervariable (también conocida como región determinante de la complementariedad o CDR) del receptor están sustituidos por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseada. El término "región determinante de la complementariedad" se refiere a secuencias de aminoácidos que juntas definen la afinidad de unión y especificidad de la región Fv natural de un sitio de unión de inmunoglobulina nativa. Véase, por ejemplo, Chothia y col. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Kabat y col. (1991) U. S. Dept. of Health and Human Services, publicación de NIH nº 91-3242). El término "región constante" se refiere a la porción de la molécula de anticuerpo que confiere funciones efectoras. En un trabajo previo dirigido a producir anticuerpos no inmunogénicos para su uso en terapia de enfermedad humana, las regiones constantes de ratón se sustituyeron por regiones constantes humanas. Las regiones constantes de los anticuerpos humanizados objeto se derivaron de inmunoglobulinas humanas. Sin embargo, estos anticuerpos humanizados todavía provocaron una respuesta inmunitaria no deseada y posiblemente peligrosa en seres humanos y hubo una pérdida de afinidad. Los anticuerpos humanizados, por ejemplo, anticuerpos anti-CD40 humanizados, para su uso en los procedimientos de la presente invención tienen características de unión similares a aquellas presentadas por el anticuerpo parental de interés, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos en el presente documento.

La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col. (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann y col. (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyen y col. (1988) *Science* 239:1534-1536), sustituyendo CDR de roedor o de roedor mutante o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Véanse también las patentes de EE.UU. nº 5.225.539; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.859.205. En algunos casos, residuos dentro de las regiones estructurales de una o más regiones variables de la inmunoglobulina humana están sustituidos por residuos no humanos correspondientes (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; y 6.180.370). Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el rendimiento de anticuerpos (por ejemplo, para obtener afinidad deseada). En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, correspondiéndose todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables con aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas de las regiones estructurales con aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles véase Jones y col. (1986) *Nature* 331:522-525; Riechmann y col. (1988) *Nature* 332:323-329; y Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" pueden incluir anticuerpos en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido con la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de la región estructural están sustituidos con residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.225.539; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.859.205. Véase también la patente de EE.UU. nº 6.180.370 y la publicación internacional nº WO 01/27160, en la que se desvelan anticuerpos humanizados y técnicas para producir anticuerpos humanizados que tienen afinidad mejorada por un antígeno predeterminado.

Los presentes procedimientos también puede ponerse en práctica usando anticuerpos xenogéneos o modificados producidos en un huésped de mamífero no humano, más particularmente un ratón transgénico, caracterizado por loci de inmunoglobulina (Ig) endógena inactivada. En tales animales transgénicos, genes endógenos competentes para la expresión de subunidades ligeras y pesadas de inmunoglobulinas huésped se convierten en no funcionales y se sustituyen con los loci de inmunoglobulina humana análogos. Estos animales transgénicos producen anticuerpos humanos en ausencia sustancial de subunidades de inmunoglobulina huésped ligera o pesada. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.877.397 y 5.939.598.

Anticuerpos completamente humanos para CD40, por ejemplo, se obtienen inmunizando ratones transgénicos. Un ratón tal se obtiene usando tecnología XenoMouse<sup>®</sup> (Abgenix; Fremont, California) y se desvela en las patentes de EE.UU. nº 6.075.181, 6.091.001 y 6.114.598. Para producir los anticuerpos desvelados en el presente documento, ratones transgénicos para el locus de la cadena pesada de IgG<sub>1</sub> humana y el locus de la cadena ligera  $\kappa$  humana se inmunizaron con células Sf 9 que expresan CD40 humana. Los ratones también puede ser transgénicos para otros isotipos. Anticuerpos anti-CD40 completamente humanos útiles en los procedimientos de la presente invención se caracterizan por propiedades de unión similares a aquellas presentadas por los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 desvelados en el presente documento.

Los fragmentos de un anticuerpo particular de interés, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40 o anticuerpo anti-CD40L, son adecuados para su uso en los procedimientos de la invención, mientras que retengan la afinidad deseada del anticuerpo de longitud completa. Así, por ejemplo, un fragmento de un anticuerpo anti-CD40 retendrá la capacidad para unirse al antígeno de superficie de linfocitos B CD40. Tales fragmentos se caracterizan por propiedades similares a las del anticuerpo de longitud completa correspondiente. Así, por ejemplo, un fragmento de un anticuerpo anti-CD40 antagonista de longitud completa se unirá específicamente a antígeno CD40 humano expresado sobre la superficie de una célula humana, y está libre de actividad antagonista significativa, pero presenta actividad antagonista cuando se une a un antígeno CD40 sobre una célula humana que expresa CD40. Tales fragmentos se denominan en el presente documento fragmentos de "unión a antígeno".

Fragmentos de unión a antígeno adecuados de un anticuerpo comprenden una parte de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión a antígeno o variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, F(ab')<sub>2</sub> y Fv y moléculas de anticuerpo monocaténario. Por "Fab" está previsto un fragmento de unión a antígeno monovalente de una inmunoglobulina que está compuesto por la cadena ligera y parte de la cadena pesada. Por F(ab')<sub>2</sub> está previsto un fragmento de unión a antígeno bivalente de una inmunoglobulina que contiene ambas cadenas ligeras y parte de ambas cadenas pesadas. Por fragmentos de anticuerpos "Fv monocaténarios" o "sFv" está previsto fragmentos que comprenden los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una cadena sencilla de polipéptidos. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.946.778, 5.260.203, 5.455.030 y 5.856.456. Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un polipéptido ligador entre los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun (1994) en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, ed. Rosenberg y Moore (Springer-Verlag, Nueva York), pág. 269-315. Fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos anti-CD40 antagonistas desvelados en el presente documento también pueden conjugarse con una citotoxina para efectuar la destrucción de las células diana, como se describe en el

presente documento más adelante.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas en fago de anticuerpos generados usando las técnicas descritas en, por ejemplo, McCafferty y col. (1990) *Nature* 348:552-554 (1990) y la patente de EE.UU. nº 5.514.548. Clackson y col. (1991) *Nature* 352:624-628 y Marks y col. (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597 describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo de nM) por intercambio de cadenas (Marks y col. (1992) *Bio/Technology* 10:779-783), además de infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse y col. (1993) *Nucleic. Acids Res.* 21:2265-2266). Así, estas técnicas son alternativas viables a técnicas de hibridomas de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto y col. (1992) *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan y col. (1985) *Science* 229:81). Sin embargo, estos fragmentos pueden ahora producirse directamente por células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de las bibliotecas en fago de los anticuerpos tratados anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Carter y col. (1992) *Bio/Technology* 10:163-167). Según otro enfoque, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> pueden aislarse directamente de cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el médico habitual.

Los anticuerpos anti-CD40 antagonistas para su uso en los procedimientos incluyen los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 desvelados en el presente documento, además de anticuerpos que se diferencian de este anticuerpo, pero retienen las CDR; y anticuerpos con una o más adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos, en las que la actividad antagonista se mide por inhibición de la proliferación y/o diferenciación de linfocitos B. También se engloban anticuerpos des-inmunizados, particularmente anticuerpos anti-CD40 antagonistas des-inmunizados, que pueden producirse como se describe en, por ejemplo, las publicaciones internacionales nº WO 98/52976 y WO 0034317. De este modo, residuos dentro de los anticuerpos anti-CD40 antagonistas de la invención se modifican de manera que conviertan los anticuerpos en no inmunogénicos o menos inmunogénicos para seres humanos mientras que retienen su actividad antagonista hacia células humanas que expresan CD40, midiéndose tal actividad por ensayos observados en cualquier parte en el presente documento. También se incluyen proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo de interés, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40 antagonista o un anticuerpo anti-CD40L antagonista, o un fragmento de los mismos, proteínas de fusión que pueden sintetizarse o expresarse a partir de vectores de polinucleótido correspondientes, como se conoce en la técnica. Tales proteínas de fusión se describen con referencia a la conjugación de anticuerpos como se observa en cualquier parte en el presente documento.

Cualquier anticuerpo conocido que tiene la especificidad de unión de interés puede tener variaciones de secuencia producidas usando procedimientos descritos en, por ejemplo, las publicaciones de patente EP 0 983 303 A1, WO 00/34317 y WO 98/52976. Por ejemplo, se ha mostrado que secuencias dentro de la CDR pueden producir un anticuerpo que se une a MHC de clase II y provocar una respuesta de linfocitos T colaboradores no deseada. Una sustitución conservativa puede permitir que el anticuerpo retenga la actividad de unión, pero que pierda su capacidad para provocar una respuesta de linfocitos T no deseada. Cualquiera de tales sustituciones conservativas o no conservativas puede hacerse usando procedimientos reconocidos en la técnica tales como aquellos observados en cualquier parte en el presente documento, y los anticuerpos resultantes también pueden usarse en los procedimientos. Los anticuerpos de variante pueden probarse rutinariamente para la actividad particular, por ejemplo, actividad antagonista, afinidad y especificidad usando procedimientos descritos en el presente documento.

Si el agente terapéutico anti-CD40 es un anticuerpo anti-CD40 antagonista, el anticuerpo anti-CD40 antagonista producido por cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, o cualquier otro procedimiento no desvelado en el presente documento, puede usarse de un modo similar al anticuerpo CHIR-12.12 o CHIR-5.9 en el que posee al menos una de las siguientes actividades biológicas: *in vitro* y/o *in vivo*: inhibición de la secreción de inmunoglobulinas por linfocitos B periféricos humanos normales estimulados por linfocitos T; inhibición de la supervivencia y/o proliferación de linfocitos B periféricos humanos normales estimulados por células que expresan CD40L o ligando de CD40 soluble (CD40Ls); inhibición de la supervivencia y/o proliferación de linfocitos B periféricos humanos normales estimulados por linfocitos T de Jurkat; inhibición de señales intracelulares antiapoptóticas de "supervivencia" en cualquier célula estimulada por CD40Ls o CD40L de fase sólida; e inhibición de la transducción de señales de CD40 en cualquier célula tras la ligación con CD40Ls o CD40L de fase sólida, deleción, anergia y/o inducción de tolerancia de células diana que llevan CD40 o células que llevan ligandos relacionados con CD40 que incluyen, pero no se limitan a, linfocitos T y linfocitos B, inducción de la expansión o activación de linfocitos T reguladores CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (véase, por ejemplo, rechazo de tejido específico para aloantígeno de donante mediante interferencia de CD40-CD40L, van Maurik y col. (2002) *J. Immunol.* 169:5401-5404), citotoxicidad mediante cualquier mecanismo (que incluye, pero no se limita a, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), regulación por disminución de la proliferación y/o apoptosis en células diana), modulación de la secreción de citocinas de células diana y/o expresión de moléculas de la superficie

celular, y combinaciones de los mismos. Ensayos para tales actividades biológicas pueden realizarse como se describe en el presente documento y en la solicitud de patente internacional nº PCT/US2004/037152 publicada como WO2005/044854 (expediente de agente nº PP20107,004 (035784/282916)) titulada “*Anticuerpos monoclonales anti-CD40 antagonistas y procedimientos para su uso*” presentada el 4 de noviembre de 2004. Véanse también los ensayos descritos en Schultze y col. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:8200-8204; Denton y col. (1998) *Pediatr: Transplant.* 2:6-15; Evans y col. (2000) *J. Immunol.* 164:688-697; Noelle (1998) *Agents Actions Suppl.* 49:17-22; Lederman y col. (1996) *Curr. Opin. Hematol.* 3:77-86; Coligan y col. (1991) *Current Protocols in Immunology* 13:12; Kwakkeboom y col. (1993) *Immunology* 79:439-444; y las patentes de EE.UU. nº 5.674.492 y 5.847.082.

Un ensayo representativo para detectar anticuerpos anti-CD40 antagonistas específicos para los epítopes de antígeno CD40 identificados en el presente documento es un “ensayo de unión competitiva”. Los ensayos de unión competitiva son ensayos serológicos en los que desconocidos se detectan y cuantifican por su capacidad para inhibir la unión de un ligando conocido marcado a su anticuerpo específico. Esto también se denomina un ensayo de inhibición competitiva. En un ensayo de unión competitiva representativo, el polipéptido CD40 marcado se precipita por anticuerpos candidatos en una muestra, por ejemplo, en combinación con anticuerpos monoclonales producidos contra uno o más epítopes de los anticuerpos monoclonales de la invención. Los anticuerpos anti-CD40 que reaccionan específicamente con un epítope de interés pueden identificarse cribando una serie de anticuerpos preparados contra una proteína CD40 o fragmento de la proteína que comprende el epítope particular de la proteína CD40 de interés. Por ejemplo, para CD40 humana, epítopes de interés incluyen epítopes que comprenden residuos de aminoácidos lineales y/o no lineales de la isoforma corta de CD40 humana (véase el acceso de GenBank nº NP\_690593) expuestos en SEC ID Nº: 10, codificados por la secuencia expuesta en SEC ID Nº: 9; véase también el acceso de GenBank nº NM\_152854), o de la isoforma larga de CD40 humana (véanse los accesos de GenBank nº CAA43045 y NP\_001241, expuestos en SEC ID Nº: 12, codificados por la secuencia expuesta en SEC ID Nº: 11; véanse los accesos de GenBank nº X60592 y NM\_001250). Alternativamente, ensayos de unión competitiva con anticuerpos anti-CD40 antagonistas adecuados previamente identificados podrían usarse para seleccionar anticuerpos monoclonales comparables a los anticuerpos previamente identificados.

Los anticuerpos empleados en tales inmunoensayos pueden marcarse o no marcarse. Los anticuerpos sin marcar pueden emplearse en aglutinación; los anticuerpos marcados pueden emplearse en una amplia variedad de ensayos, empleando una amplia variedad de marcas. La detección de la formación de un complejo anticuerpo-antígeno entre un anticuerpo anti-CD40 y un epítope de interés puede facilitarse uniendo una sustancia detectable al anticuerpo. Medios de detección adecuados incluyen el uso de marcas tales como radionúclidos, enzimas, coenzimas, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, cromógenos, sustratos enzimáticos o co-factores, inhibidores enzimáticos, complejos de grupos prostéticos, radicales libres, partículas, colorantes y similares. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminescente es luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  o  $^3\text{H}$ . Tales reactivos marcados pueden usarse en una variedad de ensayos muy conocidos tales como radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos, por ejemplo, ELISA, inmunoensayos fluorescentes y similares. Véanse por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 3.766.162; 3.791.932; 3.817.837; y 4.233.402.

Cualquiera de los anticuerpos previamente descritos, por ejemplo, anticuerpos anti-CD40 antagonistas o fragmentos de anticuerpos de los mismos, puede conjugarse antes de uso en los procedimientos. Procedimientos para producir anticuerpos conjugados se conocen en la técnica. Así, el anticuerpo puede marcarse usando un marcado indirecto o enfoque de marcado indirecto. Por “marcado indirecto” o “enfoque de marcado indirecto” está previsto que un agente quelante se una covalentemente a un anticuerpo y al menos un radionúclido se inserte en el agente quelante. Véanse, por ejemplo, los agentes quelantes y radionúclidos descritos en Srivagtava y Mease (1991) *Nucl. Med. Bio.* 18:589-603. Marcas adecuadas incluyen fluoróforos, cromóforos, átomos radiactivos (particularmente  $^{32}\text{P}$  y  $^{125}\text{I}$ ), reactivos densos en electrones, enzimas y ligandos que tienen componentes de unión específica. Las enzimas se detectan normalmente por su actividad. Por ejemplo, la peroxidasa de rábano picante se detecta normalmente por su capacidad para convertir 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) en un pigmento azul, cuantificable con un espectrofotómetro. “Componente de unión específica” se refiere a una proteína que puede unirse a una molécula de ligando con alta especificidad, como por ejemplo en el caso de un antígeno y un anticuerpo monoclonal específico para el mismo. Otros componentes de unión específica incluyen biotina y avidina o estreptavidina, IgG y proteína A, y las numerosas parejas de receptor-ligando conocidas en la técnica. Debe entenderse que la descripción anterior no pretende clasificar las diversas marcas en distintas clases, ya que la misma marca puede servir de varios modos diferentes. Por ejemplo,  $^{125}\text{I}$  puede servir de marca radiactiva o como reactivos con alta densidad electrónica. HRP puede servir de enzima o de antígeno para un mAb. Además, pueden combinarse diversas marcas para el efecto deseado. Por ejemplo, los mAb y avidina también requieren marcas en la práctica de la presente invención: así, podría marcarse un mAb con biotina y detectar su presencia con avidina marcada con  $^{125}\text{I}$ , o con un mAb anti-biotina marcado con HRP. Otras permutaciones y posibilidades serán rápidamente evidentes para aquellos expertos habituales en la materia, y se consideran equivalentes dentro del alcance de la presente invención.

Alternativamente, un anticuerpo de interés, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40, puede marcarse usando "marcado directo" o un "enfoque de marcado directo", en el que un radionúclido se une covalentemente directamente a un anticuerpo (normalmente mediante un residuo de aminoácido). Radionúclidos preferidos se proporcionan en Srivagtava y Mease (1991) arriba. Se prefiere particularmente el enfoque de marcado indirecto. Véase, por tanto, por ejemplo, las publicaciones internacionales nº WO 00/52031 y WO 00/52473, en las que un ligador se usa para unir una marca radiactiva a anticuerpos; y las formas marcadas de anticuerpos anti-CD40 se describen en la patente de EE.UU. nº 6.015.542.

#### Variantes de anticuerpos

Los procedimientos pueden llevarse a cabo usando variantes de un anticuerpo conocido en la técnica. Tales variantes retendrán las propiedades deseadas de unión del anticuerpo parental. Así, por ejemplo, si el agente terapéutico anti-CD40 que va a probarse es un anticuerpo anti-CD40 antagonista, el anticuerpo de variante retendrá las propiedades de unión del anticuerpo anti-CD40 antagonista parental, por ejemplo, el anticuerpo CHIR-12.12 o CHIR-5.9. Los procedimientos para preparar variantes de anticuerpos están generalmente disponibles en la materia. Aunque la siguiente discusión se refiere a variantes de un anticuerpo anti-CD40 antagonista, los procedimientos son generalmente aplicables a cualquier anticuerpo de interés, por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un biomarcador o marcador de pronóstico clínicamente útil desvelado en el presente documento.

Por ejemplo, las variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo anti-CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 descrito en el presente documento, pueden prepararse por mutaciones en la secuencia de ADN clonada que codifica el anticuerpo de interés. Los procedimientos para mutagénesis y alteraciones de secuencias de nucleótidos son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Walker y Gaastra, eds. (1983) *Techniques of Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, Nueva York); Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel y col. (1987) *Methods Enzymol.* 154:367-382; Sambrook y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, New York); la patente de EE.UU. nº 4.873.192; y las referencias citadas en su interior. Orientación en cuanto a sustituciones apropiadas de aminoácidos que no afectan la actividad biológica del polipéptido de interés pueden encontrarse en el modelo de Dayhoff y col. (1978) en *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.). Pueden preferirse sustituciones conservativas, tales como intercambiar un aminoácido con otro que tiene propiedades similares. Ejemplos de sustituciones conservativas incluyen, pero no se limitan a, Gly $\leftrightarrow$ Ala, Val $\leftrightarrow$ Ile $\leftrightarrow$ Leu, Asp $\leftrightarrow$ Glu, Lys $\leftrightarrow$ Arg, Asn $\leftrightarrow$ Gln y Phe $\leftrightarrow$ Trp $\leftrightarrow$ Tyr.

En la construcción de variantes de un anticuerpo de interés, por ejemplo, un polipéptido de anticuerpo anti-CD40 antagonista de interés, las modificaciones se hacen de forma que tales variantes continúen poseyendo la actividad deseada, es decir, afinidad de unión similar y, en el caso de anticuerpos anti-CD40 antagonistas, puedan unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expresado sobre la superficie de una célula humana, y estando libres de actividad antagonista significativa, pero presentando actividad antagonista cuando se unan a un antígeno CD40 sobre una célula que expresa CD40 humana. Obviamente, cualquier mutación hecha en el ADN que codifica el polipéptido de variante no debe colocar la secuencia fuera del marco de lectura y preferentemente no creará regiones complementarias que pudieran producir estructura de ARNm secundaria. Véase la publicación de solicitud de patente EP nº 75.444.

Además, la región constante de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40 antagonista, puede mutarse para alterar la función efectora de varias formas. Por ejemplo, véase la patente de EE.UU. nº 6.737.056B1 y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2004/0132101A1, que desvelan mutaciones de Fc que optimizan la unión de anticuerpos a receptores de Fc.

Preferentemente, las variantes de un anticuerpo de referencia, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40 antagonista, tienen secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 70% o el 75% de identidad de secuencias, preferentemente al menos el 80% o el 85% de identidad de secuencias, más preferentemente al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94% o el 95% de identidad de secuencias con la secuencia de aminoácidos para el anticuerpo de referencia, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 descrito en el presente documento, o para una porción más corta de la molécula de anticuerpo de referencia. Más preferentemente, las moléculas comparten al menos el 96%, 97%, 98% o el 99% de identidad de secuencias. El porcentaje de identidad de secuencias se determina usando el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda de huecos afines con una penalización por apertura por hueco de 12 y una penalización por extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se enseña en Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482-489. Una variante puede diferenciarse, por ejemplo, del anticuerpo de referencia, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40 antagonista, por tan solo 1 a 15 residuos de aminoácidos, tan solo 1 a 10 residuos de aminoácidos, tales como 6-10, tan solo 5, tan solo 4, 3, 2, o incluso 1 residuo de aminoácido.

Con respecto al alineamiento óptimo de dos secuencias de aminoácidos, el segmento contiguo de la secuencia de aminoácidos de las variantes puede tener residuos de aminoácidos adicionales o residuos de aminoácidos delecionados con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia. El segmento contiguo usado para la

comparación con la secuencia de aminoácidos de referencia incluirá al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos, y puede tener 30, 40, 50 o más residuos de aminoácidos. Pueden hacerse correcciones para identidad de secuencias asociada a sustituciones de residuos conservativos o huecos (véase el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman).

5

#### Procedimientos de terapia

Los ensayos de pronóstico *ex vivo* descritos en el presente documento también pueden usarse en procedimientos de terapia para un sujeto en necesidad de tratamiento para una enfermedad inflamatoria y/o enfermedad autoinmunitaria que está asociada a células que expresan CD40. Así, el ensayo de pronóstico *ex vivo* se lleva a cabo en un sujeto candidato y, si los resultados del ensayo predicen una respuesta favorable con tratamiento con el agente terapéutico anti-CD40, el sujeto se trata entonces con ese agente terapéutico anti-CD40. Como se observa en el presente documento anteriormente, la información obtenida del ensayo de pronóstico *ex vivo* puede usarse solo para tomar una decisión con respecto al beneficio del tratamiento con el agente terapéutico anti-CD40. Alternativamente, el ensayo de pronóstico *ex vivo* puede usarse en combinación con ensayos de pronóstico que criban para nivel de expresión, o presencia o ausencia de expresión, de uno o más de los factores relacionados con CD40 identificado en el presente documento; ensayos de pronóstico que criban para nivel de expresión, o presencia o ausencia de expresión, de uno o más marcadores de pronóstico clínicamente útiles para la enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria particular, por ejemplo, un marcador de pronóstico clínicamente útil tal como se ha identificado en el presente documento, o ambos.

De este modo, un sujeto identificado usando los ensayos de pronóstico *ex vivo* de la presente divulgación, solos o en combinación con otros ensayos de pronóstico descritos en el presente documento, puede tratarse adicionalmente con una o más dosis terapéuticamente eficaces del agente terapéutico anti-CD40 que se han identificado en el procedimiento de cribado como beneficiosas para el tratamiento de la enfermedad en el sujeto candidato. "Tratamiento" se define en el presente documento como la aplicación o administración de un agente terapéutico anti-CD40 a un sujeto, o aplicación o administración de un agente terapéutico anti-CD40 a un tejido aislado o línea celular de un sujeto, si el sujeto tiene una enfermedad autoinmunitaria y/o enfermedad inflamatoria, un síntoma asociado a una enfermedad autoinmunitaria y/o enfermedad inflamatoria o una predisposición hacia el desarrollo de una enfermedad autoinmunitaria y/o enfermedad inflamatoria, si el fin es curar, sanar, aliviar, atenuar, alterar, remediar, mejorar, corregir o afectar la enfermedad autoinmunitaria y/o enfermedad inflamatoria, cualquier síntoma asociado de la enfermedad autoinmunitaria y/o enfermedad inflamatoria, o la predisposición hacia el desarrollo de la enfermedad autoinmunitaria y/o enfermedad inflamatoria. Por "tratamiento" también está previsto la aplicación o administración de una composición farmacéutica que comprende un agente terapéutico anti-CD40 a un sujeto, o aplicación o administración de una composición farmacéutica que comprende un agente terapéutico anti-CD40 antagonista a un tejido aislado o línea celular de un sujeto, si el sujeto tiene una enfermedad autoinmunitaria y/o enfermedad inflamatoria, un síntoma asociado a una enfermedad autoinmunitaria y/o enfermedad inflamatoria, o una predisposición hacia el desarrollo de una enfermedad autoinmunitaria y/o enfermedad inflamatoria, si el fin es curar, sanar, aliviar, atenuar, alterar, remediar, mejorar, corregir o afectar la enfermedad autoinmunitaria y/o enfermedad inflamatoria, cualquier síntoma asociado de la enfermedad autoinmunitaria y/o enfermedad inflamatoria, o la predisposición hacia el desarrollo de la enfermedad autoinmunitaria y/o enfermedad inflamatoria.

Por "actividad antiinflamatoria" está prevista una reducción o prevención de la inflamación. La terapia con al menos un agente terapéutico anti-CD40 como se define en cualquier parte en el presente documento produce una respuesta fisiológica que es beneficiosa con respecto al tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria y/o enfermedad inflamatoria, si la enfermedad implica células que expresan el antígeno CD40. Se reconoce que los procedimientos pueden ser útiles en prevenir el cambio fenotípico en células tales como proliferación, activación y similares.

Por "dosis o cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" está prevista una cantidad del agente terapéutico anti-CD40 que cuando se administra provoca una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento de un paciente con una enfermedad autoinmunitaria y/o enfermedad inflamatoria. El agente terapéutico anti-CD40 es un anticuerpo anti-CD40 antagonista, un anti-CD40L anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno de los mismos, y la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD40, anticuerpo anti-CD40L, o fragmento de los mismos, está en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, de aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, o de aproximadamente 7 mg/kg a aproximadamente 12 mg/kg. Se reconoce que el procedimiento de tratamiento puede comprender una única administración de una dosis terapéuticamente eficaz o múltiples administraciones de una dosis terapéuticamente eficaz del agente terapéutico anti-CD40, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40 antagonista, anticuerpo anti-CD40L antagonista, o fragmento de unión a antígeno de los mismos.

Los ensayos de pronóstico *ex vivo* pueden usarse para determinar la base fisiológica para sensibilidad, o ausencia de sensibilidad, al tratamiento con un agente terapéutico anti-CD40 particular. Así, si una enfermedad

inflamatoria o autoinmunitaria en un sujeto es inicialmente sensible a terapia con un agente terapéutico anti-CD40, y células que expresan CD40 de la enfermedad desarrollan resistencia a esta línea de terapia, los ensayos de pronóstico *ex vivo* pueden usarse para definir qué interacción (interacciones) CD40L-CD40 contribuye(n) a la naturaleza resistente de estas células que expresan CD40.

5 También pueden usarse biomarcadores de señalización de CD40 mediada por CD40L, es decir, biomarcadores de apoptosis, proliferación y supervivencia celular, marcadores de citocinas de señalización de CD40 mediada por CD40L y factores relacionados con CD40 descritos en el presente documento, solos o en cualquier combinación de los mismos, para monitorizar la eficacia de tratamiento con un agente terapéutico anti-CD40. De este modo, un  
10 sujeto que está recibiendo tratamiento con un agente terapéutico anti-CD40, que puede o puede no haber sido previamente cribado para idoneidad del tratamiento con el agente terapéutico anti-CD40 usando un ensayo de pronóstico descrito anteriormente, se monitoriza para cambios *in vivo* en la expresión de al menos un biomarcador de apoptosis celular, proliferación y supervivencia celular, y/o una o más rutas de señalización de CD40, en las que la producción de citocinas se monitoriza opcionalmente (dependiendo del modo de acción del agente terapéutico anti-CD40) tras el tratamiento con el agente terapéutico anti-CD40. Alternativamente, o adicionalmente, el sujeto  
15 puede monitorizarse para cambios *in vivo* en el nivel de expresión de uno o más factores relacionados con CD40 seleccionados del grupo que consiste en antígeno CD40 de la superficie celular sobre células, CD40L de la superficie celular sobre células, nivel en circulación de CD40s y nivel en circulación de CD40Ls tras el tratamiento con el agente terapéutico anti-CD40.

20 De este modo, una primera muestra biológica se obtiene del sujeto antes del tratamiento con el agente terapéutico anti-CD40 de interés y se ensaya para el nivel de expresión de uno o más de estos biomarcadores y/o factores relacionados con CD40 para obtener un nivel de referencia de expresión para cada factor ensayado. Esta primera muestra biológica se denomina la "muestra biológica de referencia". Una o más muestras biológicas posteriores, del mismo tipo de tejido o fluido corporal, se obtienen del sujeto y se ensayan para el (los) mismo(s) biomarcador(es) y/o factor(es) relacionado(s) con CD40, cuando la posterior muestra biológica se obtiene tras la administración de al menos una dosis del agente terapéutico anti-CD40 de interés. La monitorización puede producirse en un único momento en el tiempo, o en múltiples momentos en el tiempo para determinar la eficacia de cualquier protocolo de tratamiento dado en el que el agente terapéutico anti-CD40 se administra al sujeto.  
25 Dependiendo del biomarcador que se ensaya, una disminución o aumento en el nivel del biomarcador entre cualesquiera dos momentos de tiempo puede ser indicativo de eficacia del agente terapéutico anti-CD40 en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria. Si la monitorización revela una disminución en el nivel de expresión de uno o más de los factores relacionados con CD40, un resultado tal puede ser indicativo de eficacia del agente terapéutico anti-CD40 en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria.

35 Así, la eficacia de tratamiento de un sujeto con un agente terapéutico anti-CD40 que bloquea o interfiere con la señalización de CD40 mediada por CD40L se monitoriza obteniendo una muestra biológica de referencia del sujeto y detectando el nivel de expresión de uno o más biomarcadores de supervivencia celular y/o una ruta de señalización de CD40 mediada por CD40L descrita en el presente documento anteriormente; administrando al menos una dosis del agente terapéutico, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40 antagonista tal como CHIR-12.12 o CHIR-5.9 o fragmento de unión a antígeno de los mismos, al sujeto; obteniendo una posterior muestra biológica del sujeto, por ejemplo, dentro de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 24 horas, que incluye aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 12 horas, aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 6 horas, aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 4 horas, y aproximadamente 1 hora a aproximadamente 4 horas; y detectando el  
40 nivel de expresión del (de los) biomarcador(es) de supervivencia celular y/o ruta de señalización de CD40 mediada por CD40L en la posterior muestra biológica; en el que una reducción en el nivel de expresión en la posterior muestra biológica en comparación con el nivel de expresión en la muestra biológica de referencia es indicativo de eficacia de tratamiento con el agente terapéutico anti-CD40. La detección puede llevarse a cabo usando cualquier procedimiento conocido en la técnica que incluye aquellos procedimientos desvelados en cualquier parte en el presente documento. En algunos ejemplos, el nivel de expresión se reduce al menos aproximadamente el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o el 100% con respecto al detectado en la muestra biológica de referencia. Un cambio de porcentaje de la referencia de al menos el 25% (es decir, al menos una reducción del 25% con respecto a la muestra biológica de referencia) es indicativo de eficacia del agente terapéutico anti-CD40, con sensibilidad intermedia indicada por un cambio de porcentaje de al menos el 30% o al menos el 40%. Preferentemente, el cambio de porcentaje de la referencia es al menos el 50% (es decir, al menos una reducción del 50% con respecto a la muestra biológica de referencia) o mayor.

60 La eficacia de tratamiento de un sujeto con un agente terapéutico anti-CD40 que bloquea o interfiere con la señalización de CD40 mediada por CD40L se monitoriza obteniendo una muestra biológica de referencia del sujeto y detectando el nivel de expresión de marcadores de citocinas de señalización de CD40 mediada por CD40L descritos en el presente documento anteriormente; administrando al menos una dosis del agente terapéutico, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40 antagonista tal como CHIR-12.12 o CHIR-5.9 o fragmento de unión a antígeno del mismo, al sujeto; obteniendo una posterior muestra biológica del sujeto, por ejemplo, dentro de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 3 semanas, que incluye aproximadamente 48 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 1 semana o aproximadamente 2 semanas, después de la dosificación; y detectando el nivel de  
65 expresión del (de los) biomarcador(es) de supervivencia celular y/o ruta de señalización de CD40 mediada por

CD40L en la posterior muestra biológica; en el que una reducción en el nivel de expresión en la posterior muestra biológica en comparación con el nivel de expresión en la muestra biológica de referencia es indicativo de eficacia del tratamiento con el agente terapéutico anti-CD40. La detección puede llevarse a cabo usando cualquier procedimiento conocido en la técnica que incluye aquellos procedimientos desvelados en cualquier parte en el presente documento. Además, las citocinas que no son afectadas por la señalización de CD40 mediada por CD40L (por ejemplo, IL-1b, GM-CSF y IL-12; véase la sección experimental en el presente documento más adelante) puede usarse como control para normalizar datos. En algunas realizaciones, el nivel de expresión se reduce al menos aproximadamente el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o el 100% con respecto al detectado en la muestra biológica de referencia. Un cambio de porcentaje de la referencia de al menos el 20% (es decir, al menos una reducción del 20% con respecto a la muestra biológica de referencia) o mayor es indicativo de eficacia del agente terapéutico anti-CD40. Las muestras biológicas de referencia que comprenden suero o extracto de suero se congelan para el posterior análisis de marcadores de citocinas.

La eficacia de tratamiento de un sujeto con un agente terapéutico anti-CD40 que bloquea o interfiere con la señalización de CD40 mediada por CD40L, o que tiene ADCC como su modo de acción, se monitoriza obteniendo una muestra biológica de referencia del sujeto y detectando el nivel de expresión de uno o más biomarcadores de apoptosis descritos en el presente documento anteriormente; administrando al menos una dosis del agente terapéutico, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40 antagonista tal como CHIR-12.12 o CHIR-5.9 o fragmento de unión a antígeno del mismo, al sujeto; obteniendo una posterior muestra biológica del sujeto, por ejemplo, dentro de aproximadamente 8 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la dosificación, y opcionalmente de nuevo aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas o aproximadamente 3 semanas después de la dosificación; y detectando el nivel de expresión del (de los) biomarcador(es) de apoptosis en la(s) posterior(es) muestra(s) biológica(s); en el que un aumento en el nivel de expresión en la(s) posterior(es) muestra(s) biológica(s) en comparación con el nivel de expresión en la muestra biológica de referencia es indicativo de eficacia de tratamiento con el agente terapéutico anti-CD40. La detección puede llevarse a cabo usando cualquier procedimiento conocido en la técnica que incluye aquellos procedimientos desvelados en cualquier parte en el presente documento. En algunos ejemplos, el nivel de expresión se eleva al menos aproximadamente el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300% o más con respecto al detectado en la muestra biológica de referencia. Un cambio de porcentaje de la referencia de al menos el 20% (es decir, al menos un aumento del 20% con respecto a la muestra biológica de referencia) o mayor es indicativo de eficacia del agente anti-terapéutico.

En todavía otros ejemplos, la eficacia de tratamiento de un sujeto con un agente terapéutico anti-CD40 que bloquea o interfiere con la señalización de CD40 mediada por CD40L, modula ADCC, o ambos, se monitoriza obteniendo una muestra biológica de referencia del sujeto y detectando el nivel de expresión de uno o más factores relacionados con CD40 descritos en el presente documento anteriormente (es decir, CD40 y/o CD40L de la superficie celular sobre células, y/o niveles en circulación de CD40s y/o CD40Ls); administrando al menos una dosis del agente terapéutico, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40 antagonista tal como CHIR-12.12 o CHIR-5.9 o fragmento de unión a antígeno del mismo, al sujeto; obteniendo una posterior muestra biológica del sujeto, por ejemplo, en el plazo de aproximadamente 1 día (es decir, 24 horas), 2 días, 3 días, 4 días o 1 semana; y detectando el nivel de expresión del factor relacionado con CD40; en el que una reducción en el nivel de expresión en la posterior muestra biológica en comparación con el nivel de expresión en la muestra biológica de referencia es indicativo de eficacia de tratamiento con el agente terapéutico anti-CD40. En algunos ejemplos, el nivel de expresión se reduce al menos aproximadamente el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o el 100% con respecto al detectado en la muestra biológica de referencia.

Se reconoce que uno cualquiera o una combinación de estos ensayos puede llevarse a cabo para monitorizar la eficacia de tratamiento de un sujeto con una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria con un agente terapéutico anti-CD40 de interés, dependiendo de su modo de acción. Si se demuestra eficacia, la posterior dosis del agente terapéutico anti-CD40 puede administrarse según la pauta de dosificación recomendada, por ejemplo, diariamente, cada dos días, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, dos veces a la semana, mensualmente, y similares. Alternativamente, el nivel de expresión *in vivo* del (de los) marcador(es) de interés (es decir, biomarcador(es) de proliferación y supervivencia celular, biomarcador(es) de rutas de señalización de CD40 mediadas por CD40L, marcador(es) de citocinas, factor(es) relacionado(s) con CD40, y cualquier combinación de los mismos, puede servir de guía para la frecuencia de dosificación, y también puede servir de indicación en cuanto a la dosis terapéuticamente eficaz que va a administrarse. De este modo, si las posteriores muestras biológicas continúan mostrando una reducción o aumento aceptable en el nivel de expresión del (de los) marcador(es) respectivo(s) de interés, adicionalmente la dosificación con el agente terapéutico anti-CD40 puede retrasarse hasta tal momento que el nivel de expresión del (de los) marcador(es) respectivo(s) se aproxime al observado en la muestra biológica de referencia. Como algunos biomarcadores pueden fluctuar independientemente de los efectos del agente terapéutico, que también variarán en semivida y tiempos de residencia, preferentemente al menos dos mediciones consecutivas (por ejemplo, dentro de un periodo de 24-48 horas) se tienen en consideración si se usa el nivel de expresión del marcador (es decir, biomarcador de apoptosis, supervivencia celular, ruta de señalización de CD40, marcador de citocinas y/o factor relacionado con CD40) como guía para la frecuencia de dosificación.

Si los resultados de estos ensayos continúan mostrando regulación por disminución deseada de la señalización

de CD40 mediada por CD40L con respecto a una disminución en la expresión de uno o más de los biomarcadores de supervivencia celular, uno o más de los biomarcadores de una ruta de señalización de CD40, y/o uno o más de los factores relacionados con CD40, y un aumento en la expresión de uno o más de los marcadores de apoptosis celular, se garantiza el posterior tratamiento con el agente terapéutico anti-CD40. Pueden recogerse muestras biológicas a diversos intervalos de tiempo durante el transcurso de un periodo de tratamiento como se observa en el presente documento anteriormente para permitir monitorizar la eficacia de tratamiento con el tiempo, y para determinar si el tratamiento debe o no continuarse o retirarse.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Introducción

Los anticuerpos anti-CD40 antagonistas usados en los ejemplos más adelante son CHIR-5.9 y CHIR-12.12. Los anticuerpos anti-CD40 CHIR-5.9 y CHIR-12.12 son anticuerpos monoclonales (mAb) anti-CD40 humana subtipo IgG<sub>1</sub> humana generados por inmunización de ratones transgénicos que llevan el locus de la cadena pesada de IgG<sub>1</sub> humana y el locus de la cadena ligera  $\kappa$  humana (tecnología XenoMouse<sup>®</sup> (Abgenix; Fremont, California)). Como inmunógeno se usaron células de insecto SF9 que expresan dominio extracelular de CD40.

Brevemente, esplenocitos de ratones inmunizados se fusionaron con células de mieloma murino SP 2/0 o P 3 x 63Ag8.653 a una relación de 10:1 usando 50% de polietilenglicol como se describe previamente por de Boer y col. (1988) J. Immunol. Meth. 113:143. Las células fusionadas se resuspendieron en medio IMDM completo complementado con hipoxantina (0,1 mM), aminopterina (0,01 mM), timidina (0,016 mM) y 0,5 ng/ml de hIL-6 (Genzyme, Cambridge, Massachusetts). Las células fusionadas se distribuyeron entonces entre los pocillos de placas de cultivo de tejido de 96 pocillos, de manera que cada pocillo contuvo 1 hibridoma en crecimiento en promedio.

Después de 10-14 días, los sobrenadantes de las poblaciones de hibridoma se cribaron para la producción de anticuerpos específicos. Para el cribado de la producción de anticuerpos específicos por los clones de hibridoma, los sobrenadantes de cada pocillo se reunieron y se probaron para especificidad por actividad anti-CD40 por ELISA primero. Los positivos se usaron entonces para tinción de células fluorescentes de linfocitos B transformados con EBV usando un ensayo de FACS convencional. Las células de hibridoma positivas se clonaron dos veces por dilución limitante en IMDM/SBF que contenía 0,5 ng/ml de hIL-6.

Un total de 31 bazos de ratón se fusionaron con las células SP2/0 de mieloma de ratón para generar 895 anticuerpos que reconocen CD40 recombinante en ELISA. En promedio, aproximadamente el 10% de hibridomas producidos usando tecnología Abgenix XenoMouse<sup>®</sup> (Abgenix; Fremont, California) puede contener la cadena ligera lambda de ratón en lugar de la cadena kappa humana. Los anticuerpos que contienen la cadena lambda ligera de ratón se seleccionaron. Un subconjunto de 260 anticuerpos que también mostraron unión a CD40 de la superficie celular se seleccionaron para el posterior análisis. Se usaron hibridomas estables seleccionados durante una serie de procedimientos de subclonación para la posterior caracterización en ensayos de unión y funcionales. Para más detalles del procedimiento de selección véase el documento PCT/US2004/037152 publicado como WO2005/044854 (expediente de agente n° PP20107.004 (035784/282916)) titulado "Anticuerpos monoclonales anti-CD40 antagonistas y procedimientos para su uso" presentado el 4 de noviembre de 2004, y publicado como el documento WO 2005/04485.

Se identificaron clones de otros 7 hibridomas como que tenían actividad antagonista. Basándose en su potencia antagonista relativa y actividades de ADCC, dos clones de hibridoma se seleccionaron para la posterior evaluación (Tabla 1 más adelante). Se llaman 131.2F8.5.9 (5.9) y 153.8E2.D10.D6.12.12 (12.12).

Tabla 1. Resumen del conjunto inicial de datos con anticuerpos anti-IgG1 de CD40 CHIR-5.9 y CHIR-12.12.

Hibridoma madre	Clones de hibridoma	Unión a la superficie celular	Antagonista	ADCC	CDC	MCC#	Región V de la secuencia de ADN
131.2F5	131.2F5.8.5.9	+++	+++	++	-	12047	SI
153.8E2	153.8E2D10D6.12.12	+++	+++	++++	-	12056	SI

La línea de hibridoma de ratón 131.2F8.5.9 (CMCC#12047) y la línea de hibridoma 153.8E2.D10.D6.12.12 (CMCC#12056) se han depositado en la Colección americana de cultivos tipo (ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209 (EE.UU.)) bajo el número de depósito de patente PTA-5542 y PTA-5543, respectivamente.

Los ADNc que codifican las regiones variables de los anticuerpos candidatos se amplificaron por PCR, se clonaron y se secuenciaron. Las secuencias de aminoácidos para la cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo

CHIR-12.12 se exponen en SEC ID N°: 2 (cadena ligera para mAb CHIR-12.12) y SEC ID N°: 4 (cadena pesada para mAb CHIR-12.12). Una variante de la cadena pesada para mAb CHIR-12.12 se muestra en SEC ID N°: 5, que se diferencia de SEC ID N°: 4 en que tiene un residuo de serina sustituido por el residuo de alanina en la posición 153 de SEC ID N°: 4. Las secuencias de nucleótidos que codifican la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo CHIR-12.12 se exponen en SEC ID N°: 1 (secuencia codificante para la cadena ligera para mAb CHIR-12.12) y SEC ID N°: 3 (secuencia codificante para la cadena pesada para mAb CHIR-12.12). Las secuencias de aminoácidos para la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo CHIR-5.9 se exponen en SEC ID N°: 6 (cadena ligera para mAb CHIR-5.9) y SEC ID N°: 7 (cadena pesada para mAb CHIR-5.9). Una variante de la cadena pesada para mAb CHIR-5.9 se muestra en SEC ID N°: 8, que se diferencia de SEC ID N°: 7 en que tiene un residuo de serina sustituido por el residuo de alanina en la posición 158 de SEC ID N°: 7.

Como es de esperar para anticuerpos derivados de hibridomas independientes, hay variación sustancial en las secuencias de nucleótidos en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). La diversidad en la región CDR3 de V<sub>H</sub> se cree que determina más significativamente la especificidad del anticuerpo.

Como se muestra por análisis de FACS, CHIR-5.9 y CHIR-12.12 se unen específicamente a CD40 humana y pueden prevenir la unión a ligando de CD40. Ambos mAb pueden competir por el ligando de CD40 previamente unido a CD40 de la superficie celular. La afinidad de unión de CHIR-5.9 a CD40 humana es  $1,2 \times 10^{-8}$  M y la afinidad de unión de CHIR-12.12 a CD40 humana es  $5 \times 10^{-10}$  M.

Los anticuerpos monoclonales CHIR-12.12 y CHIR-5.9 son antagonistas fuertes e inhiben la proliferación mediada por ligando de CD40 *in vitro* de linfocitos B normales, además de inhibir la proliferación mediada por ligando de CD40 *in vitro* de células cancerosas de pacientes con NHL y CLL. El anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 inhibe directamente la supervivencia y rutas de señalización mediadas por ligando de CD40 (CD40L) en linfocitos B humanos normales. *In vitro*, ambos anticuerpos destruyen células cancerosas primarias de pacientes con NHL por ADCC. La actividad antitumoral dependiente de la dosis se observó en un modelo de linfoma humano de xenoinjerto. Para una descripción más detallada de estos resultados, y los ensayos usados para obtenerlos, véase la solicitud de patente internacional n° PCT/US2004/037152 publicada como WO2005/044854 (expediente de agente n° PP20107.004 (035784/282916)), también titulada "Anticuerpos monoclonales anti-CD40 antagonistas y procedimientos para su uso" presentada el 4 de noviembre de 2004.

#### Ejemplo 1: CHIR-12.12 bloquea la señalización de células mediada por CD40L

El ligando de CD40 (CD40L) soluble activa linfocitos B e induce diversos aspectos de respuestas funcionales, que incluyen potenciamiento de la supervivencia y proliferación, y activación de las rutas de señalización de NF- $\kappa$ B, ERK/MAPK, PI3K/AKT y p38. Además, la estimulación de CD40 mediada por CD40L proporciona señales de supervivencia mediante la reducción de PARP escindida e inducción de las proteínas antiapoptóticas, XIAP y Mcl-1, en linfocitos B normales. La estimulación de CD40 mediada por CD40L también recluta TRAF2 y TRAF3 para unirse al dominio citoplásmico de CD40.

Los siguientes estudios demuestran que CHIR-12.12 inhibió directamente todos estos efectos de la estimulación sobre linfocitos B humanos normales. Por ejemplo, el tratamiento con CHIR-12.12 produjo elevada escisión de caspasa-9, caspasa-3 y PARP, además de la reducción de XIAP y Mcl-1 de un modo dependiente del tiempo y la dosis, restaurando la apoptosis de linfocitos B. El tratamiento con CHIR-12.12 también inhibió la fosforilación de I $\kappa$ B cinasa (IKK)  $\alpha$  y  $\beta$  (ruta de NF- $\kappa$ B), ERK, AKT y p38 en respuesta a la estimulación de CD40 mediada por CD40L. Además, se encontró que CHIR-12.12 no desencadenó estos efectos apoptóticos sin estimulación de CD40 mediada por CD40L inicial.

#### *CHIR-12.12 inhibió la supervivencia mediada por ligando de CD40 induciendo la escisión de PARP.*

En estos experimentos,  $0,6 \times 10^6$  linfocitos B humanos normales de donantes sanos (porcentaje de pureza entre el 85-95%) se estimularon con 1  $\mu$ g/ml de CD40Ls (Alexis Corporation, Bingham, Nottinghamshire, RU). Entonces se añadieron CHIR-12.12 (10  $\mu$ g/ml) e IgG de control. Las células se recogieron a 0, 20 minutos, 2 horas, 6 horas, 18 horas y 26 horas. Los controles de caspasa-9 escindida, caspasa-3 escindida, PARP escindida y  $\beta$ -actina se detectaron en lisados celulares por transferencia Western.

Brevemente, se observó que la estimulación de CD40 mediada por CD40L proporcionó señales de supervivencia ya que no produjo aumentos de caspasa-9 escindida, caspasa-3 escindida o PARP escindida con el tiempo, que indica que las células no experimentaron apoptosis. Sin embargo, el tratamiento con CHIR-12.12 produjo un aumento de estos productos de escisión, que indica que el tratamiento con CHIR-12.12 abolió los efectos de la unión de CD40L sobre la señalización de supervivencia en linfocitos B normales estimulados con CD40Ls, restaurando la apoptosis de linfocitos B (datos no mostrados).

#### *CHIR-12.12 inhibió la expresión de proteínas antiapoptóticas de "supervivencia".*

En estos experimentos,  $0,6 \times 10^6$  linfocitos B humanos normales de donantes sanos (porcentaje de pureza

entre el 85-95%) se estimularon con 1 µg/ml de CD40Ls (Alexis Corporation, Bingham, Nottinghamshire, RU). Entonces se añadieron CHIR-12.12 (10 µg/ml) e IgG de control. Las células se recogieron a 0, 20 minutos, 2 horas, 6 horas, 18 horas y 26 horas. Los controles de Mcl-1, XIAP, CD40 y β-actina se detectaron en lisados celulares por transferencia Western. Brevemente, la estimulación de CD40Ls produjo la expresión sostenida de Mcl-1 y XIAP con el tiempo. Sin embargo, el tratamiento de las células estimuladas con CD40Ls con CHIR 12.12 produjo una disminución en la expresión de estas proteínas con el tiempo (datos no mostrados). Como Mcl-1 y XIAP son señales de "supervivencia" que pueden bloquear la ruta apoptótica, estos resultados demuestran que el tratamiento con CHIR-12.12 elimina el bloqueo contra la apoptosis en linfocitos B normales estimulados con CD40Ls.

10 *El tratamiento de CHIR-12.12 inhibió la fosforilación de IKKα (Ser180) e IKKβ (Ser 181) en linfocitos B normales.*

En estos experimentos, 1,0 x 10<sup>6</sup> linfocitos B humanos normales de donantes sanos (porcentaje de pureza entre el 85-95%) se estimularon con 1 µg/ml de CD40Ls (Alexis Corporation, Bingham, Nottinghamshire, RU). Entonces se añadieron CHIR-12.12 (10 µg/ml) e IgG de control. Las células se recogieron a 0 y 20 minutos. IKKα fosforilada (Ser180) e IKKβ (Ser 181) y los controles de IKKβ total se detectaron en lisados celulares por transferencia Western.

Brevemente, la estimulación por CD40Ls produjo fosforilación de IKKα (Ser180) e IKKβ (Ser 181) con el tiempo; sin embargo, el tratamiento con CHIR-12.12 abolió esta respuesta a la estimulación de CD40Ls en linfocitos B normales (datos no mostrados).

*El tratamiento con CHIR-12.12 inhibió la supervivencia mediada por ligando de CD40 de un modo dependiente de la dosis.*

25 En estos experimentos, 0,6 x 10<sup>6</sup> linfocitos B humanos normales de donantes sanos (porcentaje de pureza entre el 85-95%) se estimularon con 1 µg/ml de CD40Ls (Alexis Corporation, Bingham, Nottinghamshire, RU). Entonces se añadieron CHIR-12.12 (0,01, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0 µg/ml) e IgG de control. Las células se recogieron a las 24 horas. Se detectaron controles de PARP escindida y β-actina en lisados celulares por transferencia Western.

30 Brevemente, el tratamiento con CHIR-12.12 produjo el aumento de la escisión de PARP en células estimuladas con CD40Ls de un modo dependiente de la dosis y, por tanto, abolió la ruta de señalización de supervivencia en linfocitos B normales estimulados con CD40Ls (datos no mostrados).

35 *CHIR-12.12 inhibió la expresión de proteínas antiapoptóticas de "supervivencia" de un modo dependiente de la dosis.*

En estos experimentos, 0,6 x 10<sup>6</sup> linfocitos B humanos normales de donantes sanos (porcentaje de pureza entre el 85-95%) se estimularon con 1 µg/ml de CD40Ls (Alexis Corporation, Bingham, Nottinghamshire, RU). Entonces se añadieron CHIR-12.12 (0,5, 2 y 10 µg/ml) e IgG de control. Las células se recogieron a las 22 horas. Se detectaron controles de Mcl-1, XIAP, PARP escindida y β-actina en lisados celulares por transferencia Western.

Brevemente, el tratamiento con CHIR-12.12 redujo la expresión de Mcl-1 y XIAP y aumentó la expresión de PARP escindida en células estimuladas con CD40Ls de un modo dependiente de la dosis, y así abolió estos bloqueos a la ruta apoptótica en linfocitos B normales estimulados con CD40Ls (datos no mostrados).

45 *CHIR-12.12 no afectó la expresión de proteínas antiapoptóticas, PARP escindida y XIAP, en ausencia de señalización de CD40L soluble.*

En estos experimentos, 1,0 x 10<sup>6</sup> linfocitos B humanos normales de donantes sanos (porcentaje de pureza entre el 85-95%) se trataron con CHIR-12.12 (10 µg/ml) e IgG de control sola (es decir, las células no se pre-estimularon con CD40Ls antes de añadir anticuerpo). Las células se recogieron a las 0, 4, 14 y 16 horas. Se detectaron controles de XIAP, PARP escindida y β-actina en lisados celulares por transferencia Western.

55 Brevemente, los resultados muestran que sin la estimulación de CD40Ls, las células expresadas aumentaron las concentraciones de PARP escindida, mientras que la expresión de XIAP permaneció constante, en tanto células de control tratadas con IgG como células CHIR-12.12 (datos no mostrados). Estos datos indican que CHIR-12.12 no provoca apoptosis en linfocitos B humanos normales sin estimulación de CD40L.

60 *CHIR-12.12 inhibe la fosforilación de IKKα (Ser180) e IKKβ (Ser181), AKT, ERK y p38 en linfocitos B normales.*

En estos experimentos, 1,0 x 10<sup>6</sup> linfocitos B humanos normales de donantes sanos (porcentaje de pureza entre el 85-95%) se privaron de suero en medio que contiene 1% de SBF y se estimularon con 1 µg/ml de CD40Ls (Alexis Corporation, Bingham, Nottinghamshire, RU). Los cultivos se trataron con CHIR-12.12 (1 y 10 µg/ml) e IgG de control. Las células se recogieron a los 0 y 20 minutos. Se detectaron fosfo-IKKα, fosfo-IKKβ, IKKβ total, fosfo-ERK, ERK total, fosfo-AKT, AKT total, fosfo-p38 y p38 total en lisados celulares por transferencia Western.

Brevemente, la estimulación de CD40Ls produjo aumentos en la fosforilación de IKK $\alpha/\beta$ , fosforilación de ERK, fosforilación de AKT y fosforilación de p38, conduciendo así a supervivencia y o proliferación de las células. El tratamiento de las células con CHIR-12.12 abolió los efectos de la estimulación de CD40Ls sobre estas rutas de señalización en linfocitos B normales (datos no mostrados).

*CHIR 12.12 inhibe rutas de señalización de múltiplex tales como PI3K y MEK/ERK en la cascada de señalización de CD40.*

En estos experimentos,  $1,0 \times 10^6$  linfocitos B humanos normales de donantes sanos (porcentaje de pureza entre el 85-95%) se privaron de suero en medio que contenía 1% de SBF y se estimularon con 1  $\mu\text{g/ml}$  de CD40Ls (Alexis Corporation, Bingham, Nottinghamshire, RU). Los cultivos también se trataron con CHIR-12.12 (1 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ), wortmanina (un inhibidor de PI3K/AKT; 1 y 10  $\mu\text{M}$ ), LY 294002 (un inhibidor de PI3K/AKT; 10 y 30  $\mu\text{M}$ ) y PD98095 (un inhibidor de MEK; 10 y 30  $\mu\text{g/ml}$ ). Las células se recogieron a los 0 y 20 minutos. Se detectaron fosfo-ERK, fosfo-AKT, AKT total, fosfo-IKK $\alpha/\beta$  y total en lisados celulares por transferencia Western.

Brevemente, los resultados muestran que CHIR-12.12 abolió la fosforilación de todas estas moléculas de transducción de señales, mientras que los inhibidores de la transducción de señales solo mostraron abolición específica de la señalización, que indica que CHIR-12.12 inhibe probablemente aguas arriba de estas moléculas de transducción de señales mediadas por la estimulación de CD40L (datos no mostrados).

*CHIR-12.12 inhibe la unión de moléculas de señalización TRAF2 y TRAF3 al dominio citoplásmico de CD40 en linfocitos B normales.*

En estos experimentos,  $4,0 \times 10^6$  linfocitos B humanos normales de donantes sanos (porcentaje de pureza entre el 85-95%) se privaron de suero durante cuatro horas en medio que contenía 1% de SBF y se estimularon con 1  $\mu\text{g/ml}$  de CD40Ls (Alexis Corporation, Bingham, Nottinghamshire, RU) durante 20 minutos. Las células se recogieron a los 0 y 20 minutos. CD40 se inmunoprecipitó usando anti-CD40 policlonal (Santa Cruz Biotechnology, CA) y se sondó en una transferencia Western con mAb anti-TRAF2 (Santa Cruz Biotechnology, CA), mAb anti-TRAF3 (Santa Cruz Biotechnology, CA) y mAb anti-CD40 (Santa Cruz Biotechnology, CA).

Brevemente, los resultados muestran que TRAF2 y TRAF3 se co-precipitaron con CD40 después de la estimulación de CD40Ls. A diferencia, el tratamiento con CHIR-12.12 abolió la formación del complejo de señalización de CD40-TRAF2/3 en linfocitos B normales estimulados con CD40Ls. No hubo cambios en la expresión de CD40 (datos no mostrados).

Sin quedar ligado a teoría, los resultados de estos experimentos, y los resultados en los ejemplos explicados resumidamente anteriormente, indican que el anticuerpo CHIR-12.12 es un anticuerpo monoclonal anti-CD40 antagonista de acción dual que tiene una combinación única de atributos. Este anticuerpo monoclonal completamente humano bloquea las rutas de señalización de CD40 mediadas por CD40L para supervivencia y proliferación de linfocitos B; este antagonismo conduce por último lugar a muerte celular. CHIR-12.12 también media en el reconocimiento y unión por células efectoras, iniciando citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Una vez que CHIR-12.12 está unido a células efectoras, enzimas citolíticas son liberadas, conduciendo a la apoptosis y lisis de linfocitos B. CHIR-12.12 es un anticuerpo antitumoral más potente que rituximab cuando se compara en modelos de tumor pre-clínicos.

#### Ejemplo 2: Evaluación de la secreción de citocinas inducidas por ligando de CD40 en células CD40+

La estimulación de CD40 por su ligando proporciona señales de supervivencia y proliferativas para linfocitos B normales. El anticuerpo anti-CD40 antagonista CHIR-12.12 no induce la proliferación de linfocitos de la sangre periférica humana, pero inhibe la proliferación de linfocitos inducida por CD40L. La señalización de CD40 también induce células para producir una variedad de citocinas. En este ejemplo se investigó la capacidad de CHIR-12.12 para modular la producción de citocinas por linfocitos B normales y monocitos.

Se cultivaron células ( $1 \times 10^5$  células por pocillo) en una placa de 96 pocillos en presencia o ausencia de CD40L (células CHO fijadas en formaldehído transfectadas con CD40,  $2 \times 10^5$  por pocillo). Las células se incubaron con hulgG1 (control) o CHIR-12.12 a 10  $\mu\text{g/ml}$  a 37 °C durante 24 horas y se recogieron los sobrenadantes. La producción de hIL-6, hIL-8, hIL-10, hTNF- $\alpha$ , hGM-CSF, hIL-1b, hIL-12p70, MCP-1 y MIP-1 $\beta$  se midió por el sistema de múltiples matrices Meso Scale Discovery® (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Mariland).

Las células cultivadas con CHIR-12.12 solo en ausencia de CD40L no produjeron ninguna de las citocinas por encima de los niveles de referencia sugiriendo que CHIR-12.12 no tiene una actividad agonista para la producción de citocinas. A diferencia, la producción inducida por CD40L de hIL-10, hTNF- $\alpha$ , hIL-8, hIL-6, MCP-1 y MIP-1 $\beta$  en linfocitos B normales (n=3) (Tabla 2). La adición de CHIR-12.12 a estos cultivos inhibió la producción de todas las citocinas (véase la Tabla 3).

Tabla 2: Secreciones de citocinas inducidas por CD40L de linfocitos B normales (los valores son veces de inducción con respecto a la referencia).

Cotoquinas	Donante 1	Donante 2	Donante 3
hIL-1b	No inducido	No inducido	No inducido
hIL-12p70	No inducido	ND	No inducido
hIL-10	3.6	ND	3.6
hGM-CSF	No inducido	ND	No inducido
hTNF- $\alpha$	3.7	4.8	22.8
hIL-8	7.7	14.7	49.3
hIL-6	5.7	3.8	20.5
MCP-1	5.5	No evaluado	1.7
MIP-1 $\beta$	2.2	2.6	17.8

Tabla 3: CHIR-12.12 inhibe la secreción de linfocitos B normales de todas las citocinas inducidas por CD40L (los valores son % de inhibición).

Cotoquinas	Donante 1	Donante 2	Donante 3
hIL-1b	No inducido	No inducido	No inducido
hIL-12p70	No inducido	ND	No inducido
hIL-10	90.5	ND	94.4
hGM-CSF	No inducido	ND	No inducido
hTNF- $\alpha$	92.8	97.4	98.5
hIL-8	98.2	84.7	99.5
hIL-6	92.0	99.9	99.3
MCP-1	55.3	No evaluado	25.7
MIP-1 $\beta$	54.4	92	92.5

CHIR-12.12 inhibió la producción de monocitos inducida por CD40L de hIL-10, hTNF- $\alpha$  hIL-8, hIL-6, MCP-1 y MIP-1 $\beta$  (n=1) (Tabla 4 frente a Tabla 5).

Tabla 4: Secreciones de citocinas inducidas por CD40L de monocitos (los valores son veces de inducción con respecto a la referencia).

Cytokine	Donor 1
hIL1-b	No inducido
hIL-12p70	No inducido
hIL-10	4.2
hGM-CSF	No inducido
hTNF- $\alpha$	13.8
hIL8	123.5
hIL6	77.9
MCP-1	289.9
MIP-1 $\beta$	161.9

Tabla 5: CHIR-12.12 inhibe la secreción de todas las citocinas de monocitos inducida por CD40L (los valores son % de inhibición).

Cytokine	Donor 1
hIL1-b	No inducido
hIL-12p70	No inducido
hIL-10	58.5
hGM-CSF	No inducido
hTNF- $\alpha$	60.1
hIL8	43.7
hIL6	64.9
MCP-1	92.6
MIP-1 $\beta$	32.4

Juntos, estos datos muestran que CHIR-12.12 es un potente antagonista para supervivencia mediada por ligando de CD40, proliferación y producción de citocinas.

La ligación de CD40 también puede inducir la expresión de VEGF en células endoteliales normales y monocitos (Melter y col. (2000) Blood 96(12):3801-3808; Flaxenburg y col. (2004) J. Immunol. 172:7503-7509), además de fibroblastos sinoviales reumatoides (Cho y col. (2000) J. Immuno. 164:5055-5061). Se cree que la señalización de CD40 mediada por CD40L en sitios inflamatorios estimula fibroblastos y la producción por monocitos/macrófagos de tejido de VEGF, conduciendo a angiogénesis, que promueve y mantiene el proceso inflamatorio crónico (véase, por ejemplo, Monaco y col. (2004) Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy 3(1):35-42). Como tales, los cambios en niveles de VEGF pueden proporcionar un marcador de citocinas útil de señalización de CD40 mediada por CD40L. Debido a que VEGF es una proteína secretada, cambios en la expresión de proteínas VEGF pueden detectarse fácilmente en sobrenadantes de cultivo celular o en plasma obtenido de muestras de sangre de pacientes usando técnicas tales como transferencia Western o ELISA. Alternativamente puede detectarse a partir del ARNm obtenido de muestras de células/tejido, usando distintas técnicas tales como transferencia Northern o RT-PCR cuantitativa.

En otro experimento, la producción inducida por CD40L de VEGF en monocitos se examina de un modo similar al descrito anteriormente. Se encuentra que la adición de CHIR-12.12 a estos cultivos celulares inhibe la producción inducida por CD40L de VEGF.

Ejemplo 3: Biomarcadores y marcadores de pronóstico

Los ensayos de pronóstico *ex vivo* y ensayos de pronóstico adicionales que van a usarse en los procedimientos requieren cribar muestras biológicas para el nivel de expresión de biomarcadores cuyas secuencias de proteínas maduras y secuencias de nucleótidos se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, la información mostrada en las Tablas 2 y 3 más adelante. Se reconoce que pueden diseñarse sondas para detectar estos biomarcadores, tanto al nivel de proteína (por ejemplo, sondas de anticuerpo) como de ácido nucleico (por ejemplo, sondas de PCR), basándose en esta información de secuencias, y que las sondas pueden diseñarse para detectar variantes de las secuencias desveladas en el presente documento.

Tabla 6. Secuencias de aminoácidos y de nucleótidos para biomarcadores.

Nombre del biomarcador	Numero de adhesión	Numero de adhesión
AKT-1	NM_005163	NP_005154
AKT-2	NM_001626	NP_001617
AKT-3	AF135794	AAD24196
PI3K	Y13892	CAA74194
PDK1	BC006339	AAH06339
IKK $\alpha$	AF012890	AAC51662
IKK $\beta$	AF031416	AAC64675
I $\kappa$ B	BT006743	Q15653
NF- $\kappa$ B	NM_003998	NP_003989

(Continuación)

	Nombre del biomarcador	Numero de adhesión	Numero de adhesión
5	MEK1	L11284 NM_002755	NP_002746
	MEK2	L11285 NM_030662	NP_109587
	MEK3	NM_002746	NP_002737
10	MEK6	U49732	AAB05035
	ERK1	NM_002746	NP_002737
	ERK2	NM_002745	NP_002736
15	p38	L35253	AAA74301
	Caspase 3	NM_004346	NP_004337
	Caspase 7	BT006683	AAP35329
20	Caspase 9	BT006911	AAP35557
	PARP	NM_001618	NP_001609
	Bcl-2	M14745	AAA35591
25	Bcl-x1	Z23115	CAA80661
	Nombre del biomarcador	Numero de adhesión	Numero de adhesión
	Mcl-1	AF118124	AAD13299
30	XIAP	U45880	AAC50373
	clAP1	U45879	AAC50372
	survivin	U75285	AAC51660
35	TRAF-1	NM_005658	NP_005649
	Ki67	X65550	CAA46519

Tabla 7. Secuencias de aminoácidos y de nucleótidos para CD40 y CD40L.

Nombre	Secuencia de nucleótidos		Secuencia de aminoácidos	
	Numero de adhesión	Identificador de secuencia	Numero de adhesión	Identificador de secuencia
45 CD40 short isoform	NM_152854	SEQ ID NO:9	NP_690593	SEQ ID NO:10
CD40 long isoform	X60592	SEQ ID NO:11	CAA43045	SEQ ID NO:12
50 CD40L	NM_000074	SEQ ID NO:13	NP_000065	SEQ ID NO:14
Soluble CD40L	NM_000074	SEQ ID NO:15 (nucleotides 139-786 of SEQ ID NO:13)	NP_000065	SEQ ID NO:16 (residues 47-261 of SEQ ID NO:14)

Ejemplo 4: Ensayos para actividad antagonista de agentes terapéuticos anti-CD40

Los siguientes ensayos pueden usarse para evaluar la actividad antagonista de un anticuerpo anti-CD40. Linfocitos B humanos para estos ensayos pueden obtenerse, por ejemplo, por aislamiento de amígdalas obtenidas de individuos que se someten a amigdalectomías, esencialmente como se describe en De Groot y col. (1990) Lymphokine Research (1990) 9:321. Brevemente, el tejido se dispersa con cuchillas de escalpelo, se agota en células fagocíticas y NK mediante tratamiento con éster metílico de L-leucina 5 mM y los linfocitos T se eliminan por un ciclo de rosetado con eritrocitos de oveja (SRBC) tratados con bromuro de 2-aminoetilisotiuronio. La pureza de las preparaciones de linfocitos B resultantes puede comprobarse por marcado inmunofluorescente indirecto con mAb anti-(CD20) B1 (Coulter Clone, Hialeah, FA) o mAb anti-(CD3) OKT3 (Ortho, Raritan, NJ) y un fragmento F(ab')<sub>2</sub> conjugado con FITC de anti-(Ig de ratón) de conejo (Zymed, San Francisco, CA), y análisis por FACS.

*Ensayo de proliferación de linfocitos B.*

Los linfocitos B ( $4 \times 10^4$  por pocillo) se cultivan en 200  $\mu$ l de IMDM complementado con 10% de suero bovino fetal en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano. Los linfocitos B se estimulan mediante la adición de anticuerpos anti-(IgM) inmovilizados (Immunobeads; 5  $\mu$ g/ml; BioRad, Richmond, California). Si se desea se añaden 100 U/ml de IL-2 recombinante. Se añaden concentraciones variables de anticuerpos monoclonales (mAb) de prueba en la aparición de los microcultivos y la proliferación se evalúa en el día 3 por medición de la incorporación de ( $^3$ H)-timidina después de pulsar 18 horas.

Un anticuerpo anti-CD40 antagonista no coestimula significativamente la proliferación de linfocitos B humanos en presencia de anti-IgM inmovilizado o en presencia de anti-IgM inmovilizado y IL-2.

*Ensayo de proliferación de linfocitos B similar a Banchemau.*

Para probar la capacidad de anticuerpos monoclonales anti-CD40 para estimular la proliferación de linfocitos B en un sistema de cultivo análogo al descrito por Banchemau y col. (1991) Science (1991) 251:70 se usan células transfectantes 3T6 de ratón que expresan la forma alélica HR de FeyRII humano. Se cultivan linfocitos B ( $2 \times 10^4$  por pocillo) en micropocillos de fondo plano en presencia de  $1 \times 10^4$  células transfectantes (irradiadas con 5000 rad) en 200  $\mu$ l de IMDM complementado con 10% de suero bovino fetal y 100 U/ml de IL-4 recombinante. Antes de la adición de los linfocitos B, las células 3T6 se dejan adherir al plástico de cultivo durante al menos 5 horas. Los mAb anti-CD40 se añaden a concentraciones variables de 15 ng/ml a 2000 ng/ml y la proliferación de linfocitos B se evalúa por medición de la incorporación de timidina en el día 7, tras pulsar 18 horas con [ $^3$ H]-timidina.

*Inhibición de la proliferación de linfocitos B estimulada por S2C6 usando mAb anti-CD40 antagonistas.*

Los anticuerpos monoclonales (mAb) anti-CD40 antagonistas también pueden caracterizarse por su capacidad para inhibir la estimulación de la proliferación de linfocitos B por un anticuerpo anti-CD40 tal como S2C6 (también conocido como SGN-14, que supuestamente es un agonista de la estimulación de CD40 de la proliferación de linfocitos B normales; Francisco y col. (2000) Cancer Res. 60:3225-3231) usando el ensayo de proliferación de linfocitos B descrito anteriormente. Linfocitos B amigdalinos humanos ( $4 \times 10^4$  por pocillo) se cultivan en 200  $\mu$ l en micropocillos en presencia de anti-IgM acoplado a perlas de Sepharose (5  $\mu$ g/ml) y mAb anti-CD40 S2C6 (1,25  $\mu$ g/ml). Se añaden concentraciones variables de un mAb anti-CD40 de interés y se evalúa la incorporación de [ $^3$ H]-timidina después de 3 días. Como mAb anti-(glucocerebrosidasa) de control puede añadirse 8E4 en concentraciones similares. Barneveld y col. (1983) Eur. J. Biochem. 134:585. Un anticuerpo anti-CD40 antagonista pueden inhibir la coestimulación de la proliferación de linfocitos B humanos inducida por anti-IgM por mAb S2C6, por ejemplo, al menos el 75% o más (es decir, la proliferación estimulada por S2C6 en presencia de un anticuerpo anti-CD40 antagonista no es superior al 25% de la observada en ausencia del anticuerpo anti-CD40 antagonista). A diferencia, no se observaría inhibición significativa con cantidades equivalentes del mAb no relevante 8E4, dirigido a  $\beta$ -glucocerebrosidasa. Barneveld y col., arriba. Un resultado tal indicaría que los mAb anti-CD40 no proporcionan señales estimulantes para la proliferación de linfocitos B humanos pero, en cambio, pueden inhibir señales estimulantes ejercidas provocando CD40 con otro mAb.

*Ensayo de activación de linfocitos B con células EL4B5.*

Zubler y col. (1985) J. Immunol. (1985) 134:3662 observaron que un subclon mutante de la línea EL-4 de timoma de ratón, conocida como EL4B5, podría estimular fuertemente linfocitos B de tanto origen murino como humano para proliferar y diferenciarse en células plasmáticas secretoras de inmunoglobulinas *in vitro*. Se encontró que esta activación era independiente de antígeno y no limitada por MHC. Para la estimulación óptima de linfocitos B humanos se necesitó la presencia de sobrenadante de linfocitos T humanos activados, pero también se produjo una respuesta de linfocitos B cuando células EL4B5 se preactivaron con 13-acetato de forbol-12-miristato (PMA) o IL-1. Zubler y col. (1987) Immunological Reviews 99:281; y Zhang y col. (1990) J. Immunol. 144:2955. La activación de linfocitos B en este sistema de cultivo es eficaz - experimentos de dilución limitante han mostrado que la mayoría de los linfocitos B humanos pueden activarse para proliferar y diferenciarse en células secretoras de anticuerpos. Wen y col. (1987) Eur. J. Immunol. 17:887.

Los linfocitos B (1000 por pocillo) se cultivan junto con células EL4B5 irradiadas (5000 rad) ( $5 \times 10^4$  por pocillo) en placas de microtitulación de fondo plano en 200  $\mu$ l de IMDM complementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, 5 ng/ml de 13-acetato de forbol-12-miristato (Sigma) y 5% de sobrenadante de linfocitos T humanos. Se añaden mAb a concentraciones variables en la aparición de los cultivos y se evalúa la incorporación de timidina en el día 6 después de pulsar 18 horas con [ $^3$ H]-timidina. Para la preparación del sobrenadante de linfocitos T, linfocitos T purificados se cultivan a una densidad de  $10^6$ /ml durante 36 horas en presencia de 1  $\mu$ g/ml de PHA y 10 ng/ml de PMA. Wen y col. (1987) Eur. J. Immunol. (1987) 17:887. El sobrenadante de linfocitos T se obtiene por centrifugación de las células y se guarda a -20  $^{\circ}$ C. Se prueba la eficacia de los sobrenadantes de linfocitos T en potenciar la proliferación de linfocitos B humanos en cultivos celulares de EL4B5-B y los sobrenadantes más eficaces se reúnen para su uso en experimentos. Cuando se evalúa el efecto de un anticuerpo anti-CD40 sobre la

proliferación de linfocitos B humanos inducidos por EL4B5, un anticuerpo monoclonal tal como MOPC-141 (IgG2b) puede añadirse como control.

5 Un anticuerpo anti-CD40 antagonista pueden inhibir la proliferación de linfocitos B estimulada por la línea celular EL4BS, por ejemplo, al menos el 75% o más (es decir, la proliferación de linfocitos B inducida por EL4B5 en presencia de un anticuerpo anti-CD40 antagonista no es superior al 25% de la observada en ausencia del anticuerpo anti-CD40 antagonista). A diferencia, un anticuerpo de control tal como MOPC-141 no tendría efecto significativo sobre la proliferación de linfocitos B inducida por EL4B5.

10 *Ensayo de linfocitos T colaboradores humanos para la producción de anticuerpos por linfocitos B.*

15 Un anticuerpo anti-CD40 antagonista puede servir de antagonista de la producción de inmunoglobulinas por linfocitos B. Un anticuerpo anti-CD40 puede probarse para este tipo de actividad antagonista evaluando la capacidad del anticuerpo para inhibir la producción de inmunoglobulinas por linfocitos B que han sido estimulados en un modo dependiente de contacto con linfocitos T activados en un ensayo de linfocitos T colaboradores. De este modo, placas de cultivo de tejido de 96 pocillos se recubren con una dilución 1:500 de fluido ascítico del mAb anti-CD3 CLB-T3/3 (CLB, Ámsterdam, Los Países Bajos). Como se indica, se añaden los mAb coestimulantes: mAbs anti-CD2 CLB-T11.1/1 y CLB-T11.2/1 (CLB, Ámsterdam, Los Países Bajos), tanto ascitis 1:1000 como mAb anti-CD28 CLB-28/1 (CLB, Ámsterdam, Los Países Bajos). Posteriormente se añaden linfocitos T amigdalinos (irradiados, 3000 rad;  $10^5$  por pocillo), linfocitos B amigdalinos ( $10^4$  por pocillo) y rIL-2 (20 U/ml). El volumen final de cada cultivo celular es 200  $\mu$ l. Después de 8 días, las células se centrifugan y se recoge el sobrenadante libre de células. Las concentraciones de IgM e IgG humana en muestras (diluidas) se estiman por ELISA como se describe más adelante.

25 Linfocitos B amigdalinos humanos ( $10^4$  /pocillo) se cultivan junto con linfocitos T purificados irradiados (3000 rad,  $10^5$  /pocillo) en placas de 96 pocillos, se recubren con mAb anti-CD3 y con o sin mAb diferentes para coestimular los linfocitos T. Después de 8 días de cultivo, los sobrenadantes se recogen para la determinación de la producción de inmunoglobulinas por los linfocitos B. La producción de inmunoglobulinas por los linfocitos B se evalúa por el ensayo de ELISA descrito más adelante. El anticuerpo anti-CD40 de interés se añade en concentraciones variables desde la aparición de los cultivos. Como control puede añadirse mAb MOPC-141.

30 Un anticuerpo anti-CD40 antagonista pueden inhibir la producción de anticuerpos IgG y IgM de linfocitos B estimulados por linfocitos T humanos al menos el 50% o más (es decir, la producción de anticuerpos inducidos por linfocitos T por linfocitos B en presencia de un anticuerpo anti-CD40 antagonista es no superior al 50% de la observada en ausencia del anticuerpo anti-CD40 antagonista). A diferencia, un anticuerpo de control tal como MOPC-141 no tendría efecto significativo sobre la producción de anticuerpos inducidos por linfocitos T por linfocitos B.

*Ensayo de ELISA para la cuantificación de inmunoglobulinas.*

40 Las concentraciones de IgM e IgG humana se estiman por ELISA. Placas de ELISA de 96 pocillos se recubren con 4  $\mu$ g/ml de mAb de ratón anti-IgG humana MH 16-01 (CLB, Ámsterdam, Los Países Bajos) o con 1,2  $\mu$ g/ml de mAb de ratón anti-IgM humana 4102 (Tago, Burlingame, CA) en tampón carbonato 0,05 M (pH = 9,6), por incubación durante 16 h a 4 °C. Las placas se lavan 3 veces con PBS-0,05% de Tween-20 (PBS-Tween) y se saturan con BSA durante 1 hora. Después de 2 lavados, las placas se incuban durante 1 h a 37 °C con diferentes diluciones de las muestras de prueba. Después de 3 lavados, la Ig unida se detecta por incubación durante 1 h a 37 °C con 1  $\mu$ g/ml de mAb de ratón dirigido contra IgG humana marcada con peroxidasa MH 16-01 (CLB) o mAb de ratón dirigido contra IgM humana MH 15-01 (CLB). Las placas se lavan 4 veces y la actividad de peroxidasa unida se revela mediante la adición de O-fenilendiamina como sustrato. Se usa suero convencional humano (H00, CLB) para establecer una curva patrón para cada ensayo.

50 Ejemplo 5: El tratamiento con CHIR-12.12 bloquea la supervivencia de CD40 mediada por ligando de CD40 y rutas de señalización en linfocitos B humanos normales

55 La activación de CD40 por ligando de CD40 (CD40L) puede regular la supervivencia, proliferación y diferenciación de linfocitos B normales. En linfocitos B, la ligación de CD40 conduce a su unión con factores asociados a receptores de factor de necrosis tumoral (TRAF) y la posterior activación de múltiples rutas de señalización aguas abajo que participan en la proliferación y supervivencia celular. La activación de esta ruta puede demostrarse *ex vivo*, cuando la adición de CD40L a linfocitos B normales cultivados promueve su supervivencia y proliferación. El estudio adicional descrito más adelante se realizó para caracterizar adicionalmente los efectos del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 sobre la supervivencia de CD40 mediada por CD40L y rutas de señalización en linfocitos B humanos normales.

65 Se purificaron linfocitos B humanos normales de sangre periférica por selección negativa usando el kit II de aislamiento de linfocitos B MACS (Miltenyi Biotech INC, Auburn, CA) y se cultivaron durante 24 h con o sin 2  $\mu$ g/ml de CD40L soluble humano recombinante (rhCD40sL) en presencia de 10  $\mu$ g/ml de CHIR-12.12 o hlgG1 de control de isotipo. Las células se lisaron y los lisados de células completas se resolvieron por SDS-PAGE y transferencia

Western usando anticuerpos específicos para cPARP, Mcl-1, Bcl-x1, p-Akt y p-p38 MAPK humana. Todas las membranas se desprendieron y se volvieron a sondear para tanto  $\beta$ -actina como proteína Akt total o p38 MAPK, según conviniera. Los resultados se muestran en la Figura 1.

5 La estimulación de CD40L de linfocitos B humanos normales disminuyó los niveles del marcador apoptótico (cPARP) y aumentó la expresión de marcadores antiapoptóticos (Mcl-1, Bcl-xl), induciendo así la proliferación/supervivencia de estas células. Adicionalmente, la supervivencia de linfocitos B inducida por CD40L se asoció a la fosforilación de Akt y p38 MAPK. A diferencia, el tratamiento con CHIR-12.12 de linfocitos B normales  
10 estimulados con CD40L *ex vivo* inhibió la expresión de las proteínas antiapoptóticas Mcl-1 y Bcl-xl, además de inhibir la fosforilación de las proteínas de señalización aguas abajo, conduciendo por último lugar a la apoptosis de linfocitos B.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> Aukerman, Lea Jallal, Bahija Luqman, Mohammad  
<120> Procedimientos para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades que tienen un componente autoinmune y/o inflamatorio  
20 <130> PP028062.0003(311608)  
<150> 60/749,336 <151> 2005-12-09  
<150> 60/682,575<151> 2005-05-18  
25 <160> 16  
<170> FastSEQ for Windows Version 4.0  
30 <210> 1  
<211> 720  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial  
35 <220>  
<223> Secuencia codificante para la cadena ligera de 12.12 anticuerpo anti-CD40 humano  
<221> CDS  
<222> (1)...(720)  
40 <400>1

45

50

55

60

65

ES 2 429 564 T3

	atg gcg ctc cct gct cag ctc ctg ggg ctg cta atg ctc tgg gtc tct	48
	Met Ala Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser	
	1 5 10 15	
5	gga tcc agt ggg gat att gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg acc	96
	Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Thr	
	20 25 30	
10	gtc acc cct gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tcc agt cag agc	144
	Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser	
	35 40 45	
15	ctc ctg tat agt aat gga tac aac tat ttg gat tgg tac ctg cag aag	192
	Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys	
	50 55 60	
20	cca ggg cag tct cca cag gtc ctg atc tct ttg ggt tct aat cgg gcc	240
	Pro Gly Gln Ser Pro Gln Val Leu Ile Ser Leu Gly Ser Asn Arg Ala	
	65 70 75 80	
25	tcc ggg gtc cct gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt	288
	Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
	85 90 95	
30	aca ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac	336
	Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr	
	100 105 110	
35	tgc atg caa gct cga caa act cca ttc act ttc ggc cct ggg acc aaa	384
	Cys Met Gln Ala Arg Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys	
	115 120 125	
40	gtg gat atc aga cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg	432
	Val Asp Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro	
	130 135 140	
45	cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg	480
	Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu	
	145 150 155 160	
50	ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat	528
	Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp	
	165 170 175	
55	aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac	576
	Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp	
	180 185 190	
60	agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa	624
	Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys	
	195 200 205	
65	gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag	672
	Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln	
	210 215 220	
70	ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag	720
	Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys *	
	225 230 235	

<210> 2  
 <211> 239  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 429 564 T3

<220>

<223> Secuencia codificante para la cadena ligera de 12.12 anticuerpo anti-CD40 humano

<400> 2

5

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

<210> 3

<211> 2016

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

45

<220>

<223> Secuencia codificante para la cadena pesada de 12.12 anticuerpo anti-CD40 humano (con intrones)

50

<400> 3

55

60

65

ES 2 429 564 T3

5 atggagtttg ggctgagctg ggttttcctt gttgctattt taagaggtgt ccagtgctag 60  
 gtgcagttgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120  
 tgtgcagcct ctggattcac cttcagtagc tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180  
 ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tcatatgagg aaagtaatag ataccatgca 240  
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagatcac gctgtatctg 300  
 caaatgaaca gcctcagaac tgaggacacg gctgtgtatt actgtgctag agatgggggt 360  
 atagcagcac ctgggcctga ctactggggc cagggaaacco tggtcaccgt ctccctcagca 420  
 agtaccaaag gcccatccgt cttccccctg gcgcccgtca gcaagagcac ctctgggggc 480  
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg 540  
 aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgac acettccccg ctgtcctaca gtccctcagga 600  
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggggcac ccagacctac 660  
 atctgcaacg tgaatcaca gcccagcaac accaaggtgg acaagagagt tgggtgagagg 720  
 ccagcacagg gagggagggt gtctgctgga agccaggctc agcgtcctct cctggacgca 780  
 tcccggctat gcagtcccag tccagggcag caaggcaggc cccgtctgcc tcttccccg 840  
 gaggcctctg cccgccccac tcatgctcag ggagagggtc ttctggcttt ttccccaggc 900  
 15 tctgggcagg cacaggctag gtgcccctaa cccaggccct gcacacaaag gggcagggtgc 960  
 tgggctcaga cctgccaaga gccatatccg ggaggaccct gccctgacc taagcccacc 1020  
 ccaaaggcca aactctccac tccctcagct cggacacctt ctctcctccc agattccagt 1080  
 aactcccaat cttctctctg cagagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc 1140  
 gtgcccagggt aagccagccc aggcctcggc ctccagctca aggcgggaca ggtgcccctag 1200  
 20 agtagcctgc atccagggac agggcccagc cgggtgctga cacgtccacc tccatctctt 1260  
 cctcagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaaccaagg 1320  
 acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg 1380  
 aagaccctga ggtcaagttc aactggtagc tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga 1440  
 caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc 1500  
 25 tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc 1560  
 cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaaggtgg gaccctgggg gtgagggggc 1620  
 cacatggaca gaggcggct cggcccaccc tctgcccctga gactgaccgc tgtaccaacc 1680  
 tctgtccccta cagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccggggag 1740  
 gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgccctggtca aaggctteta tcccagcgac 1800  
 atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1860  
 30 gtgctggact ccgacggctc cttcttctct tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1920  
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtctctgca caaccactac 1980  
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatga 2016

35 <210> 4  
 <211> 469  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Cadena pesada de 12.12 anticuerpo anti-CD40 humano  
 <400> 4

45 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Arg Gly  
 1 5 10 15  
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln  
 20 25 30

50  
 55  
 60  
 65

ES 2 429 564 T3

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45  
 Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60  
 5 Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala  
 65 70 75 80  
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ile  
 85 90 95  
 10 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr  
 115 120 125  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 130 135 140  
 15 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ala Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
 145 150 155 160  
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 165 170 175  
 20 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 180 185 190  
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 195 200 205  
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 210 215 220  
 25 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys  
 225 230 235 240  
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 245 250 255  
 30 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 260 265 270  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 275 280 285  
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 290 295 300  
 35 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 305 310 315 320  
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 325 330 335  
 40 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 340 345 350  
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 355 360 365  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
 370 375 380  
 45 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 385 390 395 400  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 405 410 415  
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 420 425 430  
 50 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 435 440 445  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 450 455 460  
 55 Leu Ser Pro Gly Lys  
 465

<210> 5

<211> 469

60 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de variante de 12.12 anticuerpo anti-CD40 humano

65

<400> 5

ES 2 429 564 T3

5 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Arg Gly  
 1 5 10 15  
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln  
 20 25 30  
 5 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45  
 Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60  
 10 Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala  
 65 70 75 80  
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ile  
 85 90 95  
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110  
 15 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr  
 115 120 125  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 130 135 140  
 20 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
 145 150 155 160  
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 165 170 175  
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 180 185 190  
 25 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 195 200 205  
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 210 215 220  
 30 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys  
 225 230 235 240  
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 245 250 255  
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 260 265 270  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 275 280 285  
 35 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 290 295 300  
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 305 310 315 320  
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 325 330 335  
 40 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 340 345 350  
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 355 360 365  
 45 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
 370 375 380  
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 385 390 395 400  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 405 410 415  
 50 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 420 425 430  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 435 440 445  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 450 455 460  
 55 Leu Ser Pro Gly Lys  
 465

<210> 6  
 <211> 239  
 <212> PRT

60 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cadena ligera de 5.9 anticuerpo anti-CD40 humano

65 <400> 6

ES 2 429 564 T3

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

<210> 7

<211> 474

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de 5.9 anticuerpo anti-CD40 humano

40 <400> 7

45

50

55

60

65

ES 2 429 564 T3

5 Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu Ala Leu Leu Leu Ala Val Leu Gln Gly  
 1 5 10  
 Val Cys Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 20 25 30  
 10 Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe  
 35 40 45  
 Thr Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60  
 15 Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser  
 65 70 75 80  
 Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser  
 85 90 95  
 Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met  
 100 105 110  
 20 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Ala Ala Gly Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr  
 115 120 125  
 Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 130 135 140  
 25 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ala Ser Lys  
 145 150 155 160  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 165 170 175  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 180 185 190  
 30 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 195 200 205  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 210 215 220  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 225 230 235 240  
 35 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 245 250 255  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 260 265 270  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 275 280 285  
 40 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 290 295 300  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 305 310 315 320  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 325 330 335  
 45 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 340 345 350  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 355 360 365  
 50 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 370 375 380  
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 385 390 395 400  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 405 410 415  
 55 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 420 425 430  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 435 440 445  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 450 455 460

<210> 8

<211> 474

<212> PRT

60

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de variante de 5.9 anticuerpo anti-CD40 humano

65 <400> 8

ES 2 429 564 T3

5 Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Leu Gln Gly  
 1 5 10  
 Val Cys Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 20 25 30  
 10 Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe  
 35 40 45  
 Thr Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60  
 15 Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser  
 65 70 75 80  
 Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser  
 85 90 95  
 20 Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met  
 100 105 110  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Ala Ala Gly Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr  
 115 120 125  
 Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 130 135 140  
 25 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 145 150 155 160  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 165 170 175  
 30 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 180 185 190  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 195 200 205  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 210 215 220  
 35 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 225 230 235 240  
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 245 250 255  
 40 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 260 265 270  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 275 280 285  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 290 295 300  
 45 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 305 310 315 320  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 325 330 335  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 340 345 350  
 50 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 355 360 365  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 370 375 380  
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 385 390 395 400  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 405 410 415  
 55 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 420 425 430  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 435 440 445  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 450 455 460  
 60 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

<210> 9  
 <211> 612  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

ES 2 429 564 T3

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(612)

5 <221> misc\_feature  
 <222> (0)...(0)  
 <223> Secuencia de codificación para la isoforma corta del CD40 humano

<400> 9

```

10      atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctc tgg ggc tgc ttg ctg acc   48
      Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
          1             5             10             15

15      gct gtc cat cca gaa cca ccc act gca tgc aga gaa aaa cag tac cta   96
      Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu
          20             25             30

20      ata aac agt cag tgc tgt tct ttg tgc cag cca gga cag aaa ctg gtg   144
      Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val
          35             40             45

25      agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc ctt cct tgc ggt gaa   192
      Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu
          50             55             60

30      agc gaa ttc cta gac acc tgg aac aga gag aca cac tgc cac cag cac   240
      Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His
          65             70             75             80

35      aaa tac tgc gac ccc aac cta ggg ctt cgg gtc cag cag aag ggc acc   288
      Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr
          85             90             95

40      tca gaa aca gac acc atc tgc acc tgt gaa gaa ggc tgg cac tgt acg   336
      Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
          100            105            110

45      agt gag gcc tgt gag agc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tcg ccc ggc   384
      Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
          115            120            125

50      ttt ggg gtc aag cag att gct aca ggg gtt tct gat acc atc tgc gag   432
      Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
          130            135            140

55      ccc tgc cca gtc ggc ttc ttc tcc aat gtg tca tct gct ttc gaa aaa   480
      Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
          145            150            155            160

60      tgt cac cct tgg aca agg tcc cca gga tcg gct gag agc cct ggt ggt   528
      Cys His Pro Trp Thr Arg Ser Pro Gly Ser Ala Glu Ser Pro Gly Gly
          165            170            175

65      gat ccc cat cat ctt cgg gat cct gtt tgc cat cct ctt ggt gct ggt   576
      Asp Pro His His Leu Arg Asp Pro Val Cys His Pro Leu Gly Ala Gly
          180            185            190

70      ctt tat caa aaa ggt ggc caa gaa gcc aac caa taa   612
      Leu Tyr Gln Lys Gly Gly Gln Glu Ala Asn Gln *
          195            200
  
```

60 <210> 10  
 <211> 203  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

65 <400> 10

ES 2 429 564 T3

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

30 <210> 11  
 <211> 834  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

35 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(834)

40 <221> misc\_feature  
 <222> (0)...(0)  
 <223> Secuencia de codificación para la isoforma larga de CD40 humano

<400> 11

45

50

55

60

65

ES 2 429 564 T3

	atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctc tgg ggc tgc ttg ctg acc	48
5	Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr	
	1 5 10 15	
	gct gtc cat cca gaa cca ccc act gca tgc aga gaa aaa cag tac cta	96
	Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu	
10	20 25 30	
	ata aac agt cag tgc tgt tct ttg tgc cag cca gga cag aaa ctg gtg	144
	Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val	
	35 40 45	
15	agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc ctt cct tgc ggt gaa	192
	Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu	
	50 55 60	
20	agc gaa ttc cta gac acc tgg aac aga gag aca cac tgc cac cag cac	240
	Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His	
	65 70 75 80	
25	aaa tac tgc gac ccc aac cta ggg ctt cgg gtc cag cag aag ggc acc	288
	Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr	
	85 90 95	
30	tca gaa aca gac acc atc tgc acc tgt gaa gaa ggc tgg cac tgt acg	336
	Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr	
	100 105 110	
35	agt gag gcc tgt gag agc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tcg ccc ggc	384
	Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly	
	115 120 125	
40	ttt ggg gtc aag cag att gct aca ggg gtt tct gat acc atc tgc gag	432

ES 2 429 564 T3

	Phe	Gly	Val	Lys	Gln	Ile	Ala	Thr	Gly	Val	Ser	Asp	Thr	Ile	Cys	Glu	
	130						135					140					
5	ccc	tgc	cca	gtc	ggc	ttc	ttc	tcc	aat	gtg	tca	tct	gct	ttc	gaa	aaa	480
	Pro	Cys	Pro	Val	Gly	Phe	Phe	Ser	Asn	Val	Ser	Ser	Ala	Phe	Glu	Lys	
	145					150					155				160		
10	tgt	cac	cct	tgg	aca	agc	tgt	gag	acc	aaa	gac	ctg	ggt	gtg	caa	cag	528
	Cys	His	Pro	Trp	Thr	Ser	Cys	Glu	Thr	Lys	Asp	Leu	Val	Val	Gln	Gln	
					165					170					175		
15	gca	ggc	aca	aac	aag	act	gat	ggt	gtc	tgt	ggg	ccc	cag	gat	cgg	ctg	576
	Ala	Gly	Thr	Asn	Lys	Thr	Asp	Val	Val	Cys	Gly	Pro	Gln	Asp	Arg	Leu	
				180					185					190			
20	aga	gcc	ctg	gtg	gtg	atc	ccc	atc	atc	ttc	ggg	atc	ctg	ttt	gcc	atc	624
	Arg	Ala	Leu	Val	Val	Ile	Pro	Ile	Ile	Phe	Gly	Ile	Leu	Phe	Ala	Ile	
			195				200						205				
25	ctc	ttg	gtg	ctg	gtc	ttt	atc	aaa	aag	gtg	gcc	aag	aag	cca	acc	aat	672
	Leu	Leu	Val	Leu	Val	Phe	Ile	Lys	Lys	Val	Ala	Lys	Lys	Pro	Thr	Asn	
		210					215					220					
30	aag	gcc	ccc	cac	ccc	aag	cag	gaa	ccc	cag	gag	atc	aat	ttt	ccc	gac	720
	Lys	Ala	Pro	His	Pro	Lys	Gln	Glu	Pro	Gln	Glu	Ile	Asn	Phe	Pro	Asp	
	225					230					235				240		
35	gat	ctt	cct	ggc	tcc	aac	act	gct	gct	cca	gtg	cag	gag	act	tta	cat	768
	Asp	Leu	Pro	Gly	Ser	Asn	Thr	Ala	Ala	Pro	Val	Gln	Glu	Thr	Leu	His	
					245					250					255		
40	gga	tgc	caa	ccg	gtc	acc	cag	gag	gat	ggc	aaa	gag	agt	cgc	atc	tca	816
	Gly	Cys	Gln	Pro	Val	Thr	Gln	Glu	Asp	Gly	Lys	Glu	Ser	Arg	Ile	Ser	
				260					265					270			
45	gtg	cag	gag	aga	cag	tga											834
	Val	Gln	Glu	Arg	Gln	*											
			275														

<210> 12  
 <211> 277  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 12

ES 2 429 564 T3

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

<210> 13  
 <211> 786  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(786)  
 <221> misc\_feature  
 <222> (0)...(0)  
 <223> CD40L

<400> 13

ES 2 429 564 T3

	atg atc gaa aca tac aac caa act tct ccc cga tct gcg gcc act gga	48
	Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly	
	1 5 10 15	
5	ctg ccc atc agc atg aaa att ttt atg tat tta ctt act gtt ttt ctt	96
	Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu	
	20 25 30	
10	atc acc cag atg att ggg tca gca ctt ttt gct gtg tat ctt cat aga	144
	Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg	
	35 40 45	
15	agg ttg gac aag ata gaa gat gaa agg aat ctt cat gaa gat ttt gta	192
	Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val	
	50 55 60	
20	ttc atg aaa acg ata cag aga tgc aac aca gga gaa aga tcc tta tcc	240
	Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser	
	65 70 75 80	
25	tta ctg aac tgt gag gag att aaa agc cag ttt gaa ggc ttt gtg aag	288
	Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys	
	85 90 95	
30	gat ata atg tta aac aaa gag gag acg aag aaa gaa aac agc ttt gaa	336
	Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu	
	100 105 110	
35	atg caa aaa ggt gat cag aat cct caa att gcg gca cat gtc ata agt	384
	Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser	
	115 120 125	
40	gag gcc agc agt aaa aca aca tct gtg tta cag tgg gct gaa aaa gga	432
	Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly	
	130 135 140	
45	tac tac acc atg agc aac aac ttg gta acc ctg gaa aat ggg aaa cag	480
	Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln	
	145 150 155 160	
50	ctg acc gtt aaa aga caa gga ctc tat tat atc tat gcc caa gtc acc	528
	Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr	
	165 170 175	
55	ttc tgt tcc aat cgg gaa gct tcg agt caa gct cca ttt ata gcc agc	576
	Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser	
	180 185 190	
60	ctc tgc cta aag tcc ccc ggt aga ttc gag aga atc tta ctc aga gct	624
	Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala	
	195 200 205	
65	gca aat acc cac agt tcc gcc aaa cct tgc ggg caa caa tcc att cac	672
	Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His	
	210 215 220	
70	ttg gga gga gta ttt gaa ttg caa cca ggt gct tcg gtg ttt gtc aat	720
	Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn	
	225 230 235 240	
75	gtg act gat cca agc caa gtg agc cat ggc act ggc ttc acg tcc ttt	768
	Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe	
	245 250 255	
80	ggc tta ctc aaa ctc tga	786
	Gly Leu Leu Lys Leu *	
	260	

ES 2 429 564 T3

<210> 14  
 <211> 261  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5  
 <400> 14

```

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

45 <210> 15  
 <211> 648  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

50 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(648)

55 <221> misc\_feature  
 <222> (0)...(0)  
 <223> CD40L Soluble

<400> 15

60

65

ES 2 429 564 T3

	cat	aga	agg	ttg	gac	aag	ata	gaa	gat	gaa	agg	aat	ctt	cat	gaa	gat	48
	His	Arg	Arg	Leu	Asp	Lys	Ile	Glu	Asp	Glu	Arg	Asn	Leu	His	Glu	Asp	
	1				5					10					15		
5	ttt	gta	ttc	atg	aaa	acg	ata	cag	aga	tgc	aac	aca	gga	gaa	aga	tcc	96
	Phe	Val	Phe	Met	Lys	Thr	Ile	Gln	Arg	Cys	Asn	Thr	Gly	Glu	Arg	Ser	
				20					25						30		
10	tta	tcc	tta	ctg	aac	tgt	gag	gag	att	aaa	agc	cag	ttt	gaa	ggc	ttt	144
	Leu	Ser	Leu	Leu	Asn	Cys	Glu	Glu	Ile	Lys	Ser	Gln	Phe	Glu	Gly	Phe	
				35				40							45		
15	gtg	aag	gat	ata	atg	tta	aac	aaa	gag	gag	acg	aag	aaa	gaa	aac	agc	192
	Val	Lys	Asp	Ile	Met	Leu	Asn	Lys	Glu	Glu	Thr	Lys	Lys	Glu	Asn	Ser	
		50					55					60					
20	ttt	gaa	atg	caa	aaa	ggg	gat	cag	aat	cct	caa	att	gcg	gca	cat	gtc	240
	Phe	Glu	Met	Gln	Lys	Gly	Asp	Gln	Asn	Pro	Gln	Ile	Ala	Ala	His	Val	
		65				70				75						80	
25	ata	agt	gag	gcc	agc	agt	aaa	aca	aca	tct	gtg	tta	cag	tgg	gct	gaa	288
	Ile	Ser	Glu	Ala	Ser	Ser	Lys	Thr	Thr	Ser	Val	Leu	Gln	Trp	Ala	Glu	
					85					90					95		
30	aaa	gga	tac	tac	acc	atg	agc	aac	aac	ttg	gta	acc	ctg	gaa	aat	ggg	336
	Lys	Gly	Tyr	Tyr	Thr	Met	Ser	Asn	Asn	Leu	Val	Thr	Leu	Glu	Asn	Gly	
				100					105						110		
35	aaa	cag	ctg	acc	ggt	aaa	aga	caa	gga	ctc	tat	tat	atc	tat	gcc	caa	384
	Lys	Gln	Leu	Thr	Val	Lys	Arg	Gln	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Ala	Gln	
			115				120						125				
40	gtc	acc	ttc	tgt	tcc	aat	cgg	gaa	gct	tcg	agt	caa	gct	cca	ttt	ata	432
	Val	Thr	Phe	Cys	Ser	Asn	Arg	Glu	Ala	Ser	Ser	Gln	Ala	Pro	Phe	Ile	
			130				135					140					
45	gcc	agc	ctc	tgc	cta	aag	tcc	ccc	ggg	aga	ttc	gag	aga	atc	tta	ctc	480
	Ala	Ser	Leu	Cys	Leu	Lys	Ser	Pro	Gly	Arg	Phe	Glu	Arg	Ile	Leu	Leu	
			145			150					155				160		
50	aga	gct	gca	aat	acc	cac	agt	tcc	gcc	aaa	cct	tgc	ggg	caa	caa	tcc	528
	Arg	Ala	Ala	Asn	Thr	His	Ser	Ser	Ala	Lys	Pro	Cys	Gly	Gln	Gln	Ser	
				165					170						175		
55	att	cac	ttg	gga	gga	gta	ttt	gaa	ttg	caa	cca	ggg	gct	tcg	gtg	ttt	576
	Ile	His	Leu	Gly	Gly	Val	Phe	Glu	Leu	Gln	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Phe	
				180					185						190		
60	gtc	aat	gtg	act	gat	cca	agc	caa	gtg	agc	cat	ggc	act	ggc	ttc	acg	624
	Val	Asn	Val	Thr	Asp	Pro	Ser	Gln	Val	Ser	His	Gly	Thr	Gly	Phe	Thr	
			195				200						205				
65	tcc	ttt	ggc	tta	ctc	aaa	ctc	tga									648
	Ser	Phe	Gly	Leu	Leu	Lys	Leu	*									
			210				215										

<210> 16  
 <211> 215  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 16

ES 2 429 564 T3

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

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para identificar un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria que es sensible a tratamiento con un agente terapéutico anti-CD40, comprendiendo dicho procedimiento:

- a) proporcionar una muestra biológica de prueba y una muestra biológica de control obtenidas de dicho sujeto, en el que dicha muestra biológica de prueba y dicha muestra biológica de control comprenden células que expresan CD40 que han sido estimuladas con un ligando de CD40;
- b) poner en contacto dicha muestra biológica de prueba con una cantidad eficaz de dicho agente terapéutico anti-CD40;
- c) detectar el nivel de al menos un biomarcador en dicha muestra biológica de prueba, en el que dicho biomarcador está seleccionado del grupo que consiste en:

- (i) un biomarcador de apoptosis celular, en el que dicho biomarcador de apoptosis está seleccionado del grupo que consiste en una proteína caspasa escindida, poli ADP-ribosa polimerasa (PARP) escindida, expresión en la superficie celular de fosfotidilserina (PS), fragmentación de ADN genómico, y cualquier combinación de las mismas;
- (ii) un biomarcador de una ruta de señalización de CD40 mediada por CD40L, en el que dicha ruta de señalización de CD40 mediada por CD40L está seleccionada del grupo que consiste en la ruta de señalización de AKT, la ruta de señalización de NF- $\kappa$ B y una ruta de señalización de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), y dicho biomarcador de dicha ruta de señalización de CD40 mediada por CD40L está seleccionada del grupo que consiste en proteína fosfo-PI3K, fosfo-PDK1, fosfo-AKT, fosfo-MEK, fosfo-ERK, fosfo-p38, fosfo-IKK $\alpha/\beta$ , fosfo-I $\kappa$ B y NF- $\kappa$ B activada; y
- (iii) un biomarcador de supervivencia celular, en el que dicho biomarcador de supervivencia celular está seleccionado del grupo que consiste en una proteína antiapoptósica que es un miembro de la familia Bcl-2, una proteína inhibidora de la apoptosis IAP y factor 1 asociado a receptor de TNF (TRAF-1); y

d) comparar el nivel de dicho al menos un biomarcador en dicha muestra biológica de prueba con el nivel de dicho al menos un biomarcador detectado en dicha muestra biológica de control, en el que dicha muestra biológica de control no se ha puesto en contacto con dicho agente terapéutico anti-CD40, en el que

- (i) un aumento en el nivel de al menos uno de dichos biomarcadores de apoptosis; y/o
- (ii) una reducción en el nivel de al menos uno de dichos biomarcadores de al menos una de dichas rutas de señalización de CD40 mediadas por CD40L; y/o
- (iii) una reducción en el nivel de al menos uno de dichos biomarcadores de supervivencia celular;

en dicha muestra biológica de prueba con respecto a dicha muestra biológica de control es indicativo de un sujeto que se beneficiaría del tratamiento con dicho agente terapéutico anti-CD40, y en el que dicho agente terapéutico anti-CD40 es un anticuerpo monoclonal anti-CD40 antagonista o fragmento de unión a antígeno del mismo que puede unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expresado sobre la superficie de un linfocito B humano, y que está libre de actividad antagonista significativa cuando se une al antígeno CD40 expresado sobre la superficie de dicho linfocito B.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichas células que expresan CD40 se estimularon *ex vivo* con un ligando de CD40 antes de dicha etapa de puesta en contacto.

3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicho ligando de CD40 está seleccionado del grupo que consiste en CD40L soluble y CD40L unido a la membrana.

4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho anticuerpo monoclonal anti-CD40 antagonista o fragmento de unión a antígeno del mismo está libre de actividad antagonista significativa en una respuesta celular.

5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho anticuerpo monoclonal anti-CD40 antagonista o fragmento de unión a antígeno del mismo está libre de actividad antagonista significativa en ensayos de más de una respuesta celular.

6. El procedimiento de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que dicho anticuerpo monoclonal anti-CD40 antagonista o fragmento de unión a antígeno del mismo actúa de antagonista de al menos una respuesta de linfocitos B seleccionada del grupo que consiste en proliferación de linfocitos B, diferenciación de linfocitos B, producción de anticuerpos, adhesión intercelular, generación de linfocitos B de memoria, cambio de isotipo, regulación por incremento de la expresión en la superficie celular de MHC de clase II y CD80/86 y secreción de citocinas pro-inflamatorias.

7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicha proteína caspasa escindida está seleccionada del grupo que consiste en caspasa-3 escindida, caspasa-7 escindida y caspasa-9 escindida.

8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la PS de la superficie celular se detecta por tinción con anexina V y en el que la fragmentación de ADN genómico se detecta por tinción TUNEL.
- 5 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicha ruta de señalización de MAPK está seleccionada del grupo que consiste en la ruta de señalización de MEK/ERK y la ruta de señalización de MEK/p38.
- 10 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho miembro de la familia Bcl-2 está seleccionado del grupo que consiste en Bcl-xl y Mcl-1.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o la reivindicación 10, en el que dicha proteína inhibidora de la apoptosis IAP está seleccionada del grupo que consiste en survivina, XIAP y cIAP1.
- 15 12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además detectar en dicha muestra biológica de prueba y dicha muestra biológica de control el nivel de al menos un marcador de citocinas de señalización de CD40.
- 20 13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que dicho marcador de citocinas está seleccionado del grupo que consiste en factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), interleucina (IL)-6, IL-8, IL-10, factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSF), factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1) y proteína 1 $\beta$  inflamatoria de macrófagos (MIP-1 $\beta$ ).
- 25 14. El procedimiento de la reivindicación 12 ó 13, en el que una reducción en el nivel de al menos uno de dichos marcadores de citocinas en dicha muestra biológica de prueba con respecto a dicha muestra biológica de control es indicativo de un sujeto que se beneficiaría del tratamiento con dicho agente terapéutico anti-CD40.
- 30 15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho anticuerpo monoclonal anti-CD40 puede unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expresado sobre la superficie de una célula que expresa CD40, modulando así la actividad de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), y en el que dicho biomarcador es un biomarcador de apoptosis.
- 35 16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que un aumento en el nivel de al menos uno de dichos biomarcadores de apoptosis dentro de dicha muestra biológica de prueba con respecto a dicha muestra biológica de control es indicativo de un sujeto que se beneficiaría del tratamiento con dicho anticuerpo anti-CD40.
- 40 17. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además detectar en una muestra biológica de dicho sujeto el nivel de expresión de CD40 de la superficie celular, el nivel de expresión de CD40L de la superficie celular, o ambos, sobre células que expresan CD40 dentro de dicha muestra biológica.
- 45 18. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además detectar el nivel de CD40 soluble en circulación o CD40L soluble en circulación en una muestra biológica recogida del sujeto.
- 50 19. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que detectar el nivel de dicho biomarcador comprende usar un anticuerpo para detectar la expresión de la proteína biomarcadora.
20. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que detectar el nivel de dicho biomarcador comprende hibridación de ácido nucleico.
- 55 21. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que detectar el nivel de dicho biomarcador comprende realizar RT-PCR cuantitativa.
22. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que dicho anticuerpo anti-CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo está seleccionado del grupo que consiste en:
- 55 a) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de CD40 humana mostrada en SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 12; y  
b) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia de CD40 humana mostrada en SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 12.
- 60 23. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que dicho anticuerpo monoclonal anti-CD40 antagonista o fragmento de unión a antígeno del mismo está seleccionado del grupo que consiste en:
- 65 (i) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio variable de la cadena ligera que contiene los residuos de la región determinante de la complementariedad (CDR) de SEC ID N°: 2 y un dominio variable de la cadena pesada que contiene los residuos de la región determinante de la complementariedad (CDR) de SEC ID N°: 4; y

(ii) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio variable de la cadena ligera que contiene los residuos de la región determinante de la complementariedad (CDR) de SEC ID N°: 6 y un dominio variable de la cadena pesada que contiene los residuos de la región determinante de la complementariedad (CDR) de SEC ID N°: 7.

5 24. El procedimiento de la reivindicación 23, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- 10 (i) SEC ID N°: 2;  
 (ii) SEC ID N°: 4;  
 (iii) SEC ID N°: 5;  
 (iv) SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 4;  
 (v) SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 5  
 15 (vi) SEC ID N°: 6;  
 (vii) SEC ID N°: 7  
 (viii) SEC ID N°: 8  
 (ix) SEC ID N°: 6 y SEC ID N°: 7; y  
 (x) SEC ID N°: 6 y SEC ID N°: 8,

20 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que dicho fragmento retiene la capacidad de unirse específicamente a antígeno CD40 humano.

25 25. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que dicho fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-CD40 está seleccionado del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento Fv y un fragmento Fv monocatenario.

30 26. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que dicha enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria está seleccionada del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico (LES), lupus discoide, nefritis lúpica, sarcoidosis, artritis juvenil, artritis reumatoide, artritis psoriásica, síndrome de Reiter, espondilitis anquilosante, artritis gotosa, rechazo de un trasplante de órgano o tejido, enfermedad de injerto frente a huésped, esclerosis múltiple, síndrome de hiper IgE, poliarteritis nodosa, cirrosis biliar primaria, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca (enteropatía sensible al gluten), hepatitis autoinmune, anemia perniciosa, anemia hemolítica autoinmune, psoriasis, esclerodermia, miastenia grave, púrpura trombocitopénica autoinmune, tiroiditis autoinmune, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad por complejos inmunes, síndrome de fatiga crónica y disfunción inmune (SFCDI), polimiositis y dermatomiositis, crioglobulinemia, trombólisis, cardiomiopatía, pénfigo vulgar, fibrosis pulmonar intersticial, sarcoidosis, diabetes mellitus tipo I y tipo II, hipersensibilidad de tipo retardado tipo 1, 2, 3 y 4, alergia o trastornos alérgicos, asma, síndrome de Churg-Strauss (granulomatosis alérgica), dermatitis atópica, dermatitis de contacto alérgica e irritante, urticaria, alergia mediada por IgE, aterosclerosis, vasculitis, miopatías inflamatorias idiopáticas, enfermedad hemolítica, enfermedad de Alzheimer  
 40 y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica.

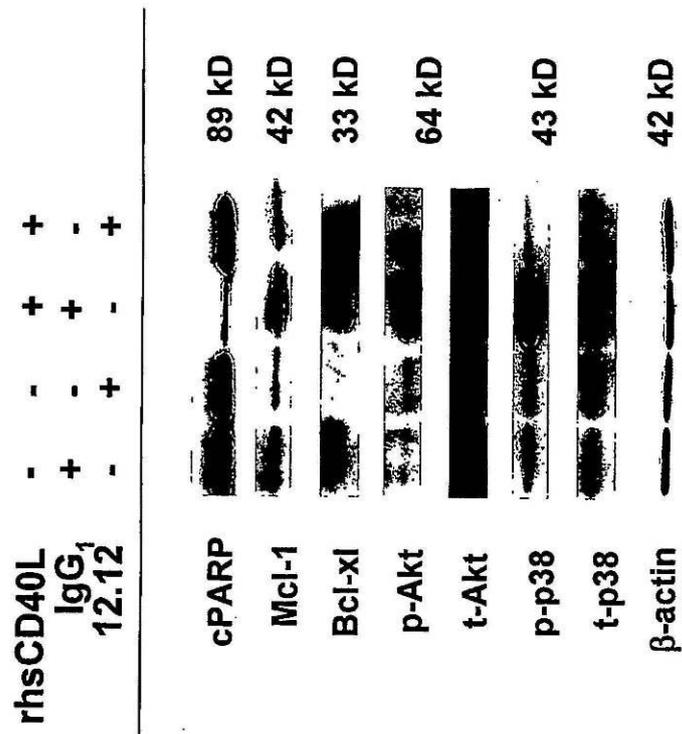


FIGURA 1