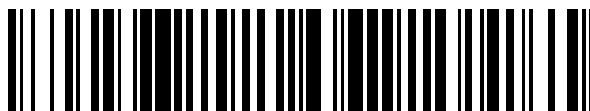


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 968**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2002 E 02802898 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 1476185**

54 Título: **Anticuerpos contra CD40**

30 Prioridad:

09.11.2001 US 348980 P

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

05.12.2013

73 Titular/es:

PFIZER PRODUCTS INC. (50.0%)
Eastern Point Road
Groton, CT 06340, US y
AMGEN FREMONT INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

BEDIAN, VAHE;
GLADUE, RONALD, P.;
CORVALAN, JOSE;
JIA, XIAO-CHI y
FENG, XIAO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 432 968 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra CD40

Antecedentes de la invención

5 El antígeno CD40 es una glucoproteína de superficie celular de 50 kDa que pertenece a la familia de Receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNF-R). (Stamenkovic y col., EMBO J. 8:1403-10 (1989)). El CD40 se expresa en muchos tipos de células normales y tumorales, incluyendo linfocitos B, células dendríticas, monocitos, macrófagos, epitelio tímico, células endoteliales, fibroblastos, y células del músculo liso. (Paulie S. y col., Cancer Immunol. Immunother. 20:23-8 (1985); Banchereau J. y col., Adv. Exp. Med. & Biol. 378:79-83 (1995); Alderson M.R. y col., J. of Exp. Med. 178:669-74 (1993); Ruggiero G. y col., J. Of Immunol. 156:3737-46 (1996); Hollenbaugh D. y col., J. of Exp. Med. 182:33-40 (1995); Yellin M.J. y col., J. of Leukocyte Biol. 58:209-16 (1995); y Lazaar A.L. y col., J. of Immunol. 161:3120-7 (1998).) CD40 se expresa en todos los linfomas B y en el 70% de todos los tumores sólidos. Aunque el antígeno CD40 se expresa de manera constitutiva, se regula positivamente en células presentadoras de antígenos mediante señales de maduración, tales como LPS, IL-1 β , IFN- γ y GM-CSF.

15 La activación de CD40 desempeña una función crítica en la regulación de respuestas inmunitarias humores y celulares. La presentación de antígenos sin activación de CD40 puede conducir a tolerancia, mientras que la señalización de CD40 puede invertir dicha tolerancia, mejorar la presentación de antígenos de todas las células presentadoras de antígenos (CPA), conducir a la secreción de citocinas y quimiocinas auxiliares, aumentar la expresión y señalización de moléculas co-estimuladoras y estimular la actividad citolítica de células inmunitarias.

20 El antígeno CD40 desempeña una función crítica en la proliferación, maduración y cambio de clase de linfocitos B. (Foy T.M. y col., Ann. Rev. of Immunol. 14:591-617 (1996)). La alteración de la ruta de señalización de CD40 conduce a la distribución anómala de isotipos de inmunoglobulina en suero, a la ausencia de inducción de linfocitos T CD4+ y a defectos en respuestas humores secundarias. Por ejemplo, el síndrome de hiper-IgM ligado al cromosoma X es una enfermedad asociada con una mutación en el gen CD40L humano caracterizada porque los individuos afectados no pueden producir anticuerpos diferentes de los del isotipo IgM, lo que indica que, para una respuesta inmunitaria eficaz, se requiere la interacción productiva entre CD40 y CD40L.

30 El acoplamiento de CD40 por CD40L conduce a la asociación del dominio citoplasmático de CD40 con los TRAF (factores asociados al TNF-R). (Lee H.H. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:1421-6 (1999); Pullen S.S. y col., Biochemistry 37: 11836-45 (1998); Grammar A.C. y col., J. of Immunol. 161:1183-93 (1998); Ishida T.K. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9437-42 (1996); Pullen S.S. y col., J. of Biol. Chem. 274:14246-54 (1999)). La interacción con los TRAF puede culminar en la activación de las dos rutas NF κ B y Jun/AP1. (Tsukamoto N. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:1234-9 (1999); Sutherland C.L. y col., J. of Immunol. 162:4720-30 (1999).) Dependiendo del tipo de célula, esta señalización conduce a mejorar la secreción de citocinas tales como IL-6 (Jeppson J.D. y col., J. of Immunol. 161:1738-42 (1998); Uejima Y. y col., Int. Arch. of Allergy & Immunol. 110:225-32, (1996), IL-8 (Gruss H.J. y col., Blood 84:2305-14 (1994); von Leoprechting A. y col., Cancer Res. 59:1287-94 (1999); Denfeld RW. y col., Europ. J. of Immunol. 26:2329-34 (1996)), IL-12 (Cella M. y col., J. of Exp. Med. 184:747-52 (1996); Ferlin W.G. y col., Europ. J. of Immunol. 28:525-31 (1998); Armant M. y col., Europ. J. of Immunol. 26:1430-4 (1996); Koch F. y col., J. of Exp. Med. 184:741-6 (1996); Seguin R. y L.H. Kasper, J. of Infect. Diseases 179:467-74 (1999); Chaussabel D. y col., Infection & Immunity 67:1929-34 (1999)), IL-15 (Kuniyoshi J.S. y col., Cellular Immunol. 193:48-58 (1999)) y quimiocinas (MIP1 α , MIP1 β , RANTES, y otras) (McDyer J.F. y col., J. of Immunol. 162:3711-7 (1999); Schaniel C. y col., J. of Exp. Med. 188:451-63 (1998); Altenburg A. y col., J. of Immunol. 162:4140-7 (1999); Deckers J.G. y col., J. of the Am. Society of Nephrology 9:1187-93 (1998)), a aumentar la expresión del MHC de clase I y II (Santos-Argumedo L. y col., Cellular Immunol. 156:272-85 (1994)) y a aumentar la expresión de moléculas de adhesión (por ejemplo, ICAM) (Lee H.H. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:1421-6 (1999); Grousson J. y col., Archives of Dermatol. Res. 290:325-30 (1998); Katada Y. y col., Europ. J. of Immunol. 26:192-200 (1996); Mayumi M. Y col., J. of Allergy & Clin. Immunol. 96:1136-44 (1995); Flores-Romo L. y col., Immunol. 79:445-51 (1993)) y moléculas coestimuladoras (por ejemplo, B7) (Roy M. y col., Europ. J. of Immunol. 25:596-603 (1995); Jones K.W. y C.J. Hackett, Cellular Immunol. 174:42-53 (1996); Caux C. y col., Journal of Exp. Med. 180:1263-72 (1994); Kiener P.A. y col., J. of Immunol. 155:4917-25 (1995)). Las citocinas inducidas por acoplamiento de CD40 mejoran la supervivencia y activación de linfocitos T.

50 Además de mejorar la función celular e inmunitaria, los efectos de la activación de CD40 incluyen: acumulación y diferenciación de células por quimiocinas y citocinas; activación de monocitos; actividad citolítica aumentada de linfocitos T citotóxicos (LCT) y linfocitos citolíticos naturales (NK); inducción de apoptosis en tumores CD40 positivos; potenciación de inmunogenicidad de tumores CD40 positivos; y producción de anticuerpos específicos de tumores. La función de la activación de CD40 en respuestas inmunitarias mediadas por células también está bien establecida, y se revisa en: Grewal y col., Ann. Rev. of Immunol. 16:111-35 (1998); Mackey y col., J. of Leukocyte Biol. 63:418-28 (1998); y Noelle R.J., Agents & Actions - Supl. 49:17-22 (1998).

Estudios que utilizan un sistema de modelo de sensibilización cruzada demuestran que la activación de las CPA por CD40 puede reemplazar los requisitos de los linfocitos T auxiliares para la generación de linfocitos T citotóxicos (LCT). (Bennett y col., Nature 393:478-480 (1998)). Pruebas realizadas con ratones que carecen de CD40L indican

un claro requisito para la señalización de CD40 en la inducción de linfocitos T auxiliares. (Grewal I.S. y col., Science 273:1864-7 (1996); Grewal I.S. y col., Nature 378:617-20 (1995). Por otra parte, la activación de CD40 transforma a los linfocitos B, tolerogénicos, portadores de antígeno, en CPA competentes. (Buhlmann JE y col., Immunity 2:645-53 (1995)). La activación de CD40 induce la maduración y diferenciación de células progenitoras de sangre de cordón umbilical en células dendríticas. (Flores-Romo, L. y col., J. of Exp. Med. 185:341-9 (1997); Mackey M.F. y col., J. of Immunol. 161:2094-8 (1998)). La activación de CD40 también induce la diferenciación de monocitos en células dendríticas funcionales. (Brossart P. y col., Blood 92:4238-47 (1998.)). Además, la activación de CD40 potencia la actividad citolítica de células NK a través de citocinas inducidas por CPA-CD40. (Carbone, E. y col., J. of Exp. Med. 185:2053-60 (1997); Martin-Fontecha A. y col., J. of Immunol. 162:5910-6 (1999)). Estas observaciones indican que el antígeno CD40 desempeña una función esencial en la iniciación y mejora de respuestas inmunitarias induciendo la maduración de las CPA, la secreción de citocinas auxiliares, la regulación positiva de moléculas coestimuladoras y la potenciación de funciones efectoras.

La función crítica de la señalización de CD40 en la iniciación y maduración de respuestas inmunitarias humorales y citotóxicas hace que este sistema sea una diana ideal para potenciar la respuesta inmunitaria. Dicha potenciación puede ser particularmente importante para crear respuestas inmunitarias eficaces contra antígenos tumorales, que generalmente se presentan contra el sistema inmunitario a través de sensibilización cruzada de las CPA activadas (Huang A.Y. y col., Ciba Foundation Symp. 187:229-44 (1994); Toes R.E.M. y col., Seminars in Immunol. 10:443-8 (1998); Albert M.L. y col., Nature 392:86-9 (1998); Bennett S.R. y col., J. of Exp. Med. 186:65-70 (1997).)

Diversos grupos han demostrado la eficacia de la activación de CD40 para respuestas antitumorales *in vitro* e *in vivo*. (Toes R.E.M. y col., Seminars in Immunol. 10:443-8 (1998)). Utilizando un modelo metastásico pulmonar de carcinoma de células renales y tumores subcutáneos por células transformadas viralmente, dos grupos han demostrado independiente que la activación de CD40 puede invertir la tolerancia contra antígenos específicos de tumores, dando como resultado una sensibilización antitumoral eficaz de linfocitos T. (Sotomayor E.M. y col., Nature Medicine 5:780-787 (1999); Diehl L. y col., Nature Medicine 5:774-9 (1999)). La actividad antitumoral en ausencia de células inmunitarias también se describió para CD40L y tratamiento de anticuerpos anti-CD40 en un modelo de línea de cáncer de mama humano en ratones SCID. (Hirano A. y col., Blood 93:2999-3007 (1999)). Recientemente se demostró que la activación de CD40 por anticuerpos anti-CD40 erradicaba linfoma CD40+ y CD40- en modelos murinos. (French R.R. y col., Nature Medicine 5:548-53 (1999)). Además, estudios previos realizados por Glennie y colaboradores llegaron a la conclusión de que la actividad señalizadora mediante anticuerpos anti-CD40 es más eficaz para inducir la eliminación tumoral *in vivo* en comparación con otros anticuerpos anti-marcadores de superficie capaces de acumular efectores. (Tutt AL y col., J. of Immunol. 161:3176-85 (1998)). De acuerdo con estas observaciones, cuando se ensayó la actividad de los anticuerpos anti-CD40 contra células tumorales CD40 + *in vivo*, la mayor parte de la actividad tumoricida, aunque no toda, se asoció con la señalización de CD40 en lugar de la de CCDA (Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos). (Funakoshi, S. y col., J. of Immunotherapy with Emphasis on Tumor Immunol. 19:93-101 (1996)). En otro estudio, se trataron células dendríticas de médula ósea *ex vivo* con diversos agentes y se ensayó la actividad antitumoral *in vivo*. Estos estudios demuestran que las CD estimuladas por CD40L eran las células más maduras y más eficaces que generaban una respuesta antitumoral.

La función esencial de CD40 en la inmunidad antitumoral también se ha demostrado comparando respuestas de ratones de tipo silvestre y CD40-/- contra vacunas tumorales. Estos estudios demuestran que ratones CD40-/- son incapaces de conseguir la inmunidad tumoral observada en ratones normales. (Mackey M.F. y col., Cancer Research 57:2569-74 (1997)). En otro estudio, se estimularon esplenocitos de ratones portadores de tumores con células tumorales y se trataron *ex vivo* con anticuerpos anti-CD40 activadores y demostraron tener actividad LCT específica tumoral potenciada. (Donepudi M. y col., Cancer Immunol. Immunother. 48:153-164 (1999)). Estos estudios demuestran que CD40 ocupa una posición crítica en la inmunidad antitumoral, tanto en tumores CD40 positivos como negativos. Dado que CD40 se expresa en linfomas, leucemias, mieloma múltiple, en una mayoría de carcinomas de nasofaringe, vejiga, ovario e hígado y algunos cánceres de mama y colorrectales, la activación de CD40 puede tener un amplio espectro de aplicaciones clínicas.

Los anticuerpos monoclonales anti-CD40 activadores pueden contribuir a la erradicación de tumores mediante diversos mecanismos importantes. Entre estos, el más importante es la activación de células dendríticas huéspedes para mejorar el procesamiento y la presentación de antígenos tumorales, así como para mejorar la presentación de antígenos o la inmunogenicidad de las propias células tumorales CD40 positivas, lo que conduce a la activación de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ específicos de tumores. Otros efectos inmunopotenciadores de señalización de CD40 (producción de quimiocinas y citocinas, acumulación y activación de monocitos y actividad citolítica CTL y NK potenciada), pueden mediar la actividad antitumoral adicional, así como la destrucción directa de tumores CD40⁺ por inducción de apoptosis o por estimulación de una respuesta humoral que conduce a CCDA. Las células tumorales apoptóticas y muertas también pueden llegar a ser una fuente importante de antígenos específicos de tumores que procesan y presentan las CPA activadas por CD40.

Por consiguiente, existe la necesidad crítica de anticuerpos agonistas anti-CD40 terapéuticos, clínicamente relevantes.

Breve descripción de los dibujos

- Las Figuras 1A-1H son alineamientos de secuencias de aminoácidos previstas de los dominios variables de cadena ligera y pesada de anticuerpos monoclonales anti-CD40 aislados con las secuencias de aminoácidos de la línea germinal de los genes de cadena ligera y pesada correspondientes. Las diferencias entre las secuencias de clones y de la línea germinal se indican con sombreado. Las secuencias de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la línea germinal se indican subrayadas. En los alineamientos de las secuencias de cadena pesada, las inserciones aparentes en la región CDR3 se indican con un guión (-) en la secuencia de la línea germinal y las deleciones aparentes en la región CDR3 se indican con un guión (-) en la secuencia del clon.
- 5
- Figura 1A: secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de la cadena ligera kappa de los mAb 3.1.1 y 7.1.2 con las secuencias de aminoácidos de la línea germinal de los genes $V_{\kappa} = A3/A19$ y $J = J_{\kappa 1}$.
- 10
- Figura 1B: secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de la cadena ligera kappa del clon 15.1.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal ($V_{\kappa} = A3/A19$ y $J = J_{\kappa 2}$);
- Figura 1C: secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de la cadena ligera kappa de los mAb 10.8.3 y 21.4.1 y la secuencia de aminoácidos en la línea germinal ($V_{\kappa} = L5$ (DP5) y $J = J_{\kappa 4}$);
- 15
- Figura 1D: secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de la cadena pesada del mAb 3.1.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal ($V_H = 3-30+$ (DP-49), $D = D4 + DIR3$ y $J = J_H6$);
- Figura 1E: secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de la cadena pesada del mAb 7.1.2 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal ($V_H = 3-30+$ (DP-49), $D = DIR5 + D1-26$ y $J = J_H6$);
- Figura 1F: secuencia de aminoácidos prevista de la cadena pesada del mAb 10.8.3 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal ($V_H = 4,35$ (VIV-4), $D = DIR3$ y $J = J_H6$);
- 20
- Figura 1G: secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de la cadena pesada del mAb 15.1.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal ($V_H = 4-59$ (DP-71), $D = D4-23$ y $J = J_H4$); y
- Figura 1H: secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de la cadena pesada del mAb 21.4.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal ($V_H = 1-02$ (DP-75), $D = DLR1$ y $J = J_H4$).
- 25
- La Figura 2A-2H son alineamientos de secuencias de aminoácidos previstas de los dominios variables de cadena ligera y pesada de anticuerpos monoclonales anti-CD40 aislados con las secuencias de aminoácidos de la línea germinal de los genes de cadena ligera y pesada correspondientes. Las diferencias entre las secuencias de clones y de la línea germinal se indican en negrita. Las secuencias de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la línea germinal se indican subrayadas. En los alineamientos de las secuencias de cadena pesada, las inserciones aparentes en la región CDR3 se indican con un guión (-) en la secuencia de la línea germinal y las deleciones aparentes en la región CDR3 se indican con un guión (-) en la secuencia del clon
- 30
- Figura 2A: secuencia de aminoácidos prevista de la cadena ligera kappa de los mAb 22.1.1, 23.5.1 y 23.29.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal ($V_{\kappa} = A3/A19$ y $J = J_{\kappa 1}$);
- Figura 2B: secuencia de aminoácidos prevista de la cadena ligera kappa del mAb 21.2.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal ($V_{\kappa} = A3/A19$ y $J = J_{\kappa 3}$);
- 35
- Figura 2C: secuencia de aminoácidos prevista de la cadena ligera kappa de los mAb 23.28.1, 23.28.1L-C92A y 24.2.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal ($V_{\kappa} = A27$ y $J = J_{\kappa 3}$);
- Figura 2D: secuencia de aminoácidos prevista de la cadena pesada del mAb 21.2.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal ($V_H = 3-30+$, $D = DIR3 + D6-19$ y $J = J_H4$);
- 40
- Figura 2E: secuencia de aminoácidos prevista de la cadena pesada de los mAb 22.1.1, 22.1.1H-C109A y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal ($V_H = 3-30+$, $D = D1-1$ y $J = J_H6$);
- Figura 2F: secuencia de aminoácidos prevista de la cadena pesada del mAb 23.5.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal ($V_H = 3-30+$, $D = D4-17$ y $J = J_H6$);
- Figura 2G: secuencia de aminoácidos prevista de la cadena pesada del mAb 23.29.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal ($V_H = 3-30,3$, $D = D4-17$ y $J = J_H6$); y
- 45
- Figura 2H: secuencia de aminoácidos prevista de la cadena pesada del mAb 23.28.1, 23.28.1 H-D16E y 24.2.1 y la secuencia de aminoácidos de la línea germinal ($V_H = 4-59$, $D = D1R1 + D4-17$ y $J = J_H5$).
- La Figura 3 es una curva de respuesta a la dosis que ilustra la capacidad de un anticuerpo anti-CD40 de la invención (21.4.1) de mejorar la producción de IL-12p40 por células dendríticas humanas.

La Figura 4 es una curva de respuesta a la dosis que ilustra la capacidad de un anticuerpo anti-CD40 de la invención (21.4.1) de mejorar la producción de IL-12p70 por células dendríticas humanas.

5 La Figura 5 es un gráfico que ilustra la capacidad de un anticuerpo anti-CD40 de la invención (21.4.1) para aumentar la inmunogenicidad de células Jy estimuladoras y mejorar la actividad los LCT (linfocitos T citotóxicos) contra células Jy diana.

La Figura 6 es una curva de inhibición de crecimiento tumoral que ilustra el crecimiento reducido de tumores Daudi CD40 positivos en ratones beige SCID tratados con un anticuerpo anti-CD40 de la invención (21.4.1).

10 La Figura 7 es una curva de inhibición de crecimiento tumoral que ilustra el crecimiento reducido de tumores K562 CD40 negativos en ratones beige SCID tratados con un anticuerpo anti-CD40 de la invención (21.4.1) y con células dendríticas humanas y linfocitos T humanos.

La Figura 8 muestra la inhibición del crecimiento de tumores K562 CD40 negativos en ratones SCID con diferentes concentraciones del mAb agonista anti-CD40, 23.29.1.

La Figura 9 muestra la inhibición del crecimiento de tumores K562 CD40 negativos en ratones SCID con diferentes concentraciones del mAb agonista anti-CD40, 3.1.1.

15 La Figura 10 muestra la inhibición del crecimiento de tumores Raji CD40 positivos en presencia y en ausencia de células dendríticas y linfocitos T en ratones SCID por un mAb agonista anti-CD40.

La Figura 11 muestra la inhibición del crecimiento de tumores Raji CD40 positivos en ratones SCID por anticuerpos agonistas anti-CD40.

20 La Figura 12 muestra la inhibición del crecimiento de células de cáncer de mama BT 474 en ratones beige SCID por anticuerpos agonistas anti-CD40.

La Figura 13 muestra la inhibición del crecimiento de tumores de próstata PC-3 en ratones beige SCID por anticuerpos agonistas anti-CD40.

La Figura 14 es una curva de supervivencia de ratones beige SCID a los que se inyecta (iv) células tumorales Daudi y a los que se trata con anticuerpos agonistas anti-CD40.

25 La Figura 15 es un análisis de transferencia de Western de anticuerpos agonistas anti-CD40 contra CD40 humano en condiciones reductoras (R) y no reductoras (NR).

La Figura 16 es un alineamiento de los dominios D1-D4 del CD40 de ratón y de ser humano.

La Figura 17 es un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de CD40 de ratón y de ser humano que muestra la localización de los sitios de fusión de las quimeras.

30 La Figura 18 es un grupo de diagramas esquemáticos de las construcciones de CD40 quiméricas.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o parte de unión a antígeno del mismo que se une a CD40 y que tiene las especificaciones como se define en las reivindicaciones.

35 La invención proporciona una composición que comprende dicho anticuerpo anti-CD40, o parte de unión a antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición puede comprender adicionalmente otro componente, tal como un agente anti-tumoral o un agente formador de imágenes. En el presente documento también se describen procedimientos de diagnóstico y terapéuticos.

La invención proporciona una línea celular aislada, tal como un hibridoma, que produce dicho anticuerpo anti-CD40 o parte de unión a antígeno del mismo.

40 La invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena pesada y/o ligera de dicho anticuerpo anti-CD40, o partes de unión a antígeno del mismo.

La invención proporciona vectores y células huésped que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico, así como procedimientos para producir de manera recombinante los polipéptidos codificados por dichas moléculas de ácido nucleico.

45 En el presente documento también se describen animales transgénicos no humanos que expresan la cadena pesada y/o ligera de dicho anticuerpo anti-CD40, o partes de unión a antígeno del mismo.

La invención también proporciona el uso de dicho anticuerpo o fragmento del mismo en el tratamiento de cáncer o para mejorar la respuesta inmunitaria. En el presente documento también se describe un procedimiento para tratar a

un sujeto que lo necesite con una cantidad eficaz de una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo anti-CD40, o partes de unión a antígeno del mismo. La invención se especifica mucho más en las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención

5 Definiciones y técnicas generales

A menos que se defina en contra en el presente documento, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrán el mismo significado que el normalmente entendido por los expertos en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera otra cosa, los términos en singular incluirán el plural y los términos en plural incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas y técnicas utilizadas en relación con células y cultivos tisulares, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y de ácidos nucleicos e hibridación descritas en el presente documento son las bien conocidas y normalmente utilizadas en la técnica.

Los procedimientos y técnicas de la presente invención se realizan generalmente de acuerdo con los procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica y se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva salvo que se indique En contra. Véase, por ejemplo, Sambrook y col. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989.) y Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), y Harlow y Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1990).

Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como normalmente se realizan en la técnica o se describe en el presente documento. La nomenclatura, procedimientos y técnicas de laboratorio utilizados en relación con química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica, descritos en el presente documento, son los bien conocidos y normalmente utilizados en la técnica. Para la síntesis química, análisis químicos, preparaciones farmacéuticas, formulación y administración y tratamiento de pacientes se utilizan técnicas convencionales

Se entenderá que, salvo que se indique en contra, los siguientes términos tendrán los siguientes significados:

El término "polipéptido" incluye proteínas naturales o artificiales, fragmentos de proteína y análogos de polipéptidos de una secuencia de proteína. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

Las expresiones "proteína aislada", "polipéptido aislado" o "anticuerpo aislado" se refiere a una proteína, un polipéptido o un anticuerpo que, debido a su origen o fuente de procedencia, (1) no está asociado con componentes naturalmente asociados que le acompañan en su estado natural, (2) carece de otras proteínas de la misma especie, (3) se expresa por una célula de una especie diferente, o (4) no se produce en la naturaleza. Por tanto, un polipéptido que se sintetiza químicamente o que se sintetiza en un sistema celular diferente al de la célula a partir del cual se origina naturalmente estará "aislado" de sus componentes naturalmente asociados. Una proteína también puede presentarse sustancialmente libre de componentes naturalmente asociados por aislamiento, utilizando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en la técnica.

Como ejemplos de anticuerpos aislados se incluyen un anticuerpo anti-CD40 que se ha purificado por afinidad utilizando CD40, un anticuerpo anti-CD40 que ha sintetizado un hibridoma u otra línea celular *in vitro*, y un anticuerpo anti-CD40 humano procedente de un ratón transgénico.

Una proteína o un polipéptido es "sustancialmente puro", "sustancialmente homogéneo" o está "sustancialmente purificado" cuando al menos aproximadamente del 60 al 75 % de una muestra presenta una sola especie de polipéptido. El polipéptido o la proteína puede ser monomérico(a) o multimérico(a). Un polipéptido o una proteína sustancialmente puro(a) comprenderá típicamente aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % en p/p de una muestra de proteína, más normalmente aproximadamente el 95 %, y preferentemente tendrá una pureza de más del 99 %. La pureza u homogeneidad de la proteína puede mostrarse mediante diversos medios bien conocidos en la técnica, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra de proteína, seguido por visualización de una sola banda polipeptídica después de tefir el gel con un tinte bien conocido en la técnica. Para determinados fines, puede proporcionarse mayor resolución utilizando HPLC u otros medios bien conocidos en la técnica de purificación.

La expresión "fragmento polipéptido", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que tiene una delección amino-terminal y/o carboxilo-terminal, pero en el que el resto de la secuencia de aminoácidos es idéntico a las posiciones correspondientes en la secuencia de origen natural. En algunas realizaciones, los fragmentos tienen una longitud de al menos 5, 6, 8 o 10 aminoácidos. En otras realizaciones, los fragmentos tienen una longitud de al menos 14, al menos 20, al menos 50 o al menos 70, 80, 90, 100, 150 o 200 aminoácidos.

La expresión "análogo polipeptídico", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que comprende un segmento que tiene una identidad sustancial con una parte de una secuencia de aminoácidos y que

tiene al menos una de las siguientes propiedades: (1) unión específica a CD40 en condiciones de unión adecuadas, (2) capacidad para activar CD40, (3) capacidad de regular positivamente la expresión de moléculas de superficie celular, tales como ICAM, MHC-II, B7-1, B7-2, CD71, CD23 y CD83, o (4) capacidad de potenciar la secreción de citocinas tales como IFN- β 1, IL-2, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-23. Típicamente, los análogos polipeptídicos comprenden una sustitución (o inserción o delección) de aminoácidos conservativa con respecto a la secuencia de origen natural. Típicamente, los análogos tienen una longitud de al menos 20 o 25 aminoácidos, preferentemente una longitud de al menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 o 200 aminoácidos o mayor, y a menudo puede ser tan largos como un polipéptido de origen natural de longitud completa.

Las sustituciones de aminoácidos preferidas son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos de proteínas y (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de dichos análogos. Los análogos pueden incluir diversas mutaciones de una secuencia distinta de la secuencia peptídica de origen natural. Por ejemplo, en la secuencia de origen natural (preferentemente en la parte del polipéptido fuera del dominio (o dominios) que forma los contactos intermoleculares) pueden realizarse sustituciones, sencillas o múltiples, de aminoácidos (preferentemente sustituciones de aminoácidos conservativas). Una sustitución de aminoácidos conservativa no debe cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia parental (por ejemplo, un reemplazo de aminoácido no debe tender a romper una hélice que se produce en la secuencia parental, o a alterar otros tipos de estructura secundaria que caracteriza la secuencia parental). Ejemplos de estructuras polipeptídicas secundarias y terciarias reconocidas en la técnica se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W.H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, NY (1991)); y Thornton y col., *Nature* 354:105 (1991).

Habitualmente, en la industria farmacéutica se utilizan análogos no peptídicos como fármacos con propiedades análogas a las del péptido molde. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "miméticos peptídicos" o "peptidomiméticos". Fauchere, *J. Adv. Drug Res.* 15:29 (1986); Veber y Freidinger, *TINS* pág. 392 (1985); y Evans y col., *J. Med. Chem.* 30:1229 (1987). Dichos compuestos a menudo se desarrollan utilizando modelado molecular automatizado. Los miméticos peptídicos, que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles, pueden utilizarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigmático (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o una actividad farmacológica deseada), tal como un anticuerpo humano, pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace seleccionado del grupo que consiste en: -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂-, -CH=CH- (cis y trans), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- y -CH₂SO-, mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso con un aminoácido D del mismo tipo (por ejemplo, D lisina en lugar de L lisina) también puede utilizarse para generar péptidos más estables. Además, pueden generarse péptidos restringidos que comprenden una secuencia consenso o una secuencia consenso sustancialmente idéntica mediante procedimientos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch, *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992); por ejemplo, añadiendo restos internos de cisteína capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

Un "anticuerpo" se refiere a un anticuerpo completo o a una parte de unión a antígeno del mismo, que compite con el anticuerpo intacto por la unión específica. Véase, en líneas generales, *Fundamental Immunology*, cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, Nueva York (1989)). Las partes de unión a antígeno pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Las partes de unión a antígeno incluyen, entre otras, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb y regiones determinantes de la complementariedad (CDR), anticuerpos monocatenarios (scFv), anticuerpos quiméricos, diacuerpos y polipéptidos que contienen al menos una parte de un anticuerpo que es suficiente para conferir la unión específica del antígeno con el polipéptido.

Desde el extremo N al extremo C, los dos dominios variables de cadena ligera y pesada comprenden las regiones FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio se realiza según las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md (1987 y 1991)), o Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia y col., *Nature* 42:878-883 (1989).

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo al cual se hace referencia mediante un número, es un anticuerpo monoclonal que se obtiene del hibridoma del mismo número. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 3.1.1 se obtiene del hibridoma 3.1.1.

Como se usa en el presente documento, un fragmento Fd se refiere a un fragmento de anticuerpo que consiste en los dominios V_H y C_H 1; un fragmento Fv consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo; y un fragmento dAb (Ward y col., *Nature* 341:544-546 (1989)) consiste en un dominio V_H.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monocatenario (scFv) en el que los dominios V_L y V_H se aparean para formar una molécula monovalente (mediante un engarce sintético que los permite constituirse como una sola cadena de proteína. (Bird y col., *Science* 242:423-426 (1988) y Huston y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:5879-5883 (1988)). En algunas realizaciones, los anticuerpos son diacuerpos, es decir, anticuerpos bivalentes en los que los dominios V_H y V_L se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero que utilizan un engarce que es

demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios de la misma cadena, forzando de esta manera el apareamiento de los dominios con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno. (Véase, por ejemplo, Holliger P. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993), y Poljak RJ y col., Structure 2: 1121-1123 (1994).) En algunas realizaciones, en una molécula pueden incorporarse una o más CDR de un anticuerpo de la invención de manera covalente o no covalente para generar una inmunoadhesina que se una específicamente a CD40. En dichas realizaciones, la CDR (o las CDR) puede incorporarse como parte de una cadena polipeptídica más grande, puede unirse de manera covalente con otra cadena polipeptídica o puede incorporarse de manera no covalente.

En realizaciones que tienen uno o más sitios de unión, los sitios de unión pueden ser idénticos o diferentes entre sí.

Como se usa en el presente documento, la expresión “anticuerpo humano” significa cualquier anticuerpo en el que todas las secuencias de dominio variable y constante son secuencias humanas. Estos anticuerpos pueden prepararse de diversas maneras, como se describe más adelante.

La expresión “anticuerpo quimérico”, como se usa en el presente documento, significa un anticuerpo que comprende regiones de dos o más anticuerpos diferentes. En una realización, una o más de las CDR proceden de un anticuerpo anti-CD40 humano. En otra realización, todas las CDR proceden de un anticuerpo anti-CD40 humano. En otra realización, las CDR de más de un anticuerpo anti-CD40 humano se combinan en un anticuerpo quimérico. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender una CDR1 de la cadena ligera de un primer anticuerpo anti-CD40 humano, una CDR2 de la cadena ligera de un segundo anticuerpo anti-CD40 humano y una CDR3 de la cadena ligera de un tercer anticuerpo anti-CD40 humano y las CDR de la cadena pesada pueden proceder de uno o más anticuerpos anti-CD40 distintos. Además, las regiones marco conservadas pueden proceder de uno de los mismos anticuerpos anti-CD40 o de uno o más humanos diferentes.

Como se usa en el presente documento, “anticuerpo activador” (denominado también en el presente documento “anticuerpo agonista”) significa un anticuerpo que aumenta al menos aproximadamente un 20% una o más actividades de CD40 cuando se añade a una célula, tejido u organismo que expresa CD40. En algunas realizaciones, el anticuerpo activa la actividad de CD40 al menos un 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %. En algunas realizaciones, el anticuerpo activador se añade en presencia de CD40L. En algunas realizaciones, la actividad del anticuerpo activador se mide utilizando un ensayo de regulación positiva con moléculas de superficie de sangre entera. Véase el Ejemplo VII. En otra realización, la actividad del anticuerpo activador se mide utilizando un ensayo con células dendríticas para medir la liberación de IL-12. Véase el Ejemplo VIII. En otra realización, la actividad del anticuerpo activador se mide utilizando un modelo tumoral *in vivo*. Véase el Ejemplo X.

Siguiendo las enseñanzas de la presente memoria descriptiva, un experto en la técnica puede preparar fácilmente fragmentos o análogos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina. Los extremos amino y carboxilo preferidos de fragmentos o análogos se producen cerca de los límites de dominios funcionales. Los dominios estructurales y funcionales pueden identificarse comparando los datos de las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos con las bases de datos de secuencias públicas o patentadas. Preferentemente, para identificar motivos de secuencias o predecir dominios de conformación de proteínas previstos que se producen en otras proteínas de estructura y/o función conocida se utilizan procedimientos de comparación informatizados. Se conocen procedimientos para identificar secuencias de proteínas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida. Véase Bowie y col, Science 253:164 (1991).

La expresión “resonancia de plasmón superficial”, como se usa en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite analizar interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en concentraciones de proteína con una matriz biodetectora, utilizando, por ejemplo, el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, N.J.). Para descripciones adicionales, véase Jonsson, U. y col., Ann. Biol. Clin. 51:19-26 (1993); Jonsson, U. y col. Biotechniques 11:620-627 (1991); Jonsson, B. y col, J. Mol. Recognit. 8:125-131 (1995); y Johnsson B. y col., Anal. Biochem. 198:268-277 (1991).

El término “ K_D ” se refiere a la constante de disociación del equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

La expresión “epítope” incluye cualquier determinante de proteína capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o a un receptor de linfocitos T. Los determinantes epitópicos normalmente consisten en grupos de moléculas de superficie químicamente activos tales como cadenas laterales de aminoácidos o de azúcares y normalmente tienen tres características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación del equilibrio es $\leq \mu\text{M}$, preferentemente $\leq 100 \text{ nM}$ y más preferentemente $\leq 10 \text{ nM}$.

Como se usa en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase Immunology – A Synthesis (2ª edición, ES Golub y D.R. Gren, Eds, Sinauer Associates, Sunderland, Mass (1991)).

El término “polinucleótido” como se denomina en el presente documento significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de

cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas mono y bicatenarias.

La expresión “polinucleótido aislado”, como se usa en el presente documento, significa un polinucleótido de origen genómico, ADNc, o sintético o alguna combinación de los mismos, que debido a su origen el “polinucleótido aislado” (1) no está asociado con ninguna o una parte de un polinucleótido con el cual el “polinucleótido aislado” se encuentra en la naturaleza, (2) está unido operativamente a un polinucleótido con el cual no está unido en la naturaleza o (3) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia más larga.

El término “oligonucleótido”, como se usa en el presente documento, incluye nucleótidos de origen natural y modificados unidos entre sí por enlaces oligonucleotídicos de origen natural y no natural. Los oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótidos que generalmente comprenden una longitud de 200 bases o menor. Preferentemente, los oligonucleótidos tienen una longitud de 10 a 60 bases y más preferentemente una longitud de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 a 40 bases. Normalmente los oligonucleótidos son monocatenarios, por ejemplo, para cebadores y sondas; aunque los oligonucleótidos pueden ser bicatenarios, por ejemplo, para su uso en la construcción de un mutante génico. Los oligonucleótidos de la invención pueden ser oligonucleótidos con sentido o antisentido.

La expresión “oligonucleótidos de origen natural”, como se usa en el presente documento, incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. La expresión “nucleótidos modificados”, como se usa en el presente documento, incluye nucleótidos con grupos glucídicos modificados o sustituidos y similares. La expresión “enlaces oligonucleotídicos”, a la cual se hace referencia en el presente documento, incluye enlaces oligonucleotídicos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforoanilato, fosforoamidato y similares. Véase, por ejemplo, La Planche y col., Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec y col., J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984); Stein y col., Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988); Zon y col., Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon y col., Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, págs. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Patente de Estados Unidos Nº 5.151.510; Uhlmann y Peyman, Chemical Reviews 90:543 (1990). Si se desea, un oligonucleótido puede incluir un marcador de detección.

Las secuencias “unidas operativamente” incluyen secuencias de control de expresión que son contiguas al gen de interés y secuencias de control de expresión que actúan en *trans* o a una distancia para controlar el gen de interés. La expresión “secuencias de control de expresión”, como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y procesamiento de secuencias codificantes a las que están unidas. Las secuencias de control de expresión incluyen secuencias adecuadas de inicio de la transcripción, terminación, promotoras y potenciadoras; señales procesadoras de ARN eficaces tales como señales de corte y empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan ARNm citoplasmático; secuencias que potencian la eficacia de la traducción (es decir, secuencias consenso Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de las proteínas y, cuando se desee, secuencias que potencian la secreción de proteínas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en procariontes, dichas secuencias de control generalmente incluyen secuencias promotoras, sitios de unión a ribosomas, y secuencias de terminación de la transcripción; en eucariotes, generalmente, dichas secuencias de control incluyen secuencias promotoras y de terminación de la transcripción. La expresión “secuencias de control” pretende incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y procesamiento, y también pueden incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder, y secuencias compañeras de fusión.

El término “vector”, como se usa en el presente documento, significa una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha unido. En algunas realizaciones, el vector es un plásmido, es decir, un bucle circular de ADN bicatenario en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. En algunas realizaciones, el vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. En algunas realizaciones, los vectores pueden replicarse, de manera autónoma, en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamíferos). En otras realizaciones, los vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped después de la introducción en la célula huésped y por lo tanto se replican junto con el genoma del huésped. Además, determinados vectores pueden dirigir la expresión de genes con los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento “vectores de expresión recombinante” (o simplemente, “vectores de expresión”).

La expresión “célula huésped recombinante” (o simplemente “célula huésped”), como se usa en el presente documento, significa una célula en la cual se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que “célula huésped recombinante” y “célula huésped” no sólo se refiere a la célula sujeto particular sino también la progenie de dicha célula. Debido a que pueden producirse determinadas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, dicha progenie puede no ser de hecho idéntica a la célula parental, pero no obstante se incluye dentro del alcance de la expresión “célula huésped” como se usa en el presente documento.

La expresión “se hibrida selectivamente” se refiere en el presente documento a unión de manera detectable y específica. Los polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de los mismos de acuerdo con la invención se hibridan selectivamente con cadenas de ácido nucleico en condiciones de hibridación y lavado que minimizan cantidades

apreciables de unión detectable con ácidos nucleicos no específicos. Pueden utilizarse "condiciones de alta rigurosidad" o "altamente rigurosas" para conseguir condiciones de hibridación selectivas como se conoce en la técnica y se trata en el presente documento. Un ejemplo de condiciones de "alta rigurosidad" o "altamente rigurosas" es la incubación de un polinucleótido con otro polinucleótido, en el que un polinucleótido puede fijarse a una superficie sólida, tal como una membrana, en un tampón de hibridación de 6X SSPE o SSC, formamida al 50 %, reactivo de Denhardt 5X, SDS al 0,5 %, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado, desnaturalizado, a una temperatura de hibridación de 42 °C durante 12-16 horas, seguido de doble lavado a 55 °C utilizando un tampón de lavado de 1X SSC, SDS al 0,5 %. Véase también Sambrook y col., citado anteriormente, páginas 9,50-9,55.

La expresión "porcentaje de identidad de secuencia" en el contexto de secuencias de ácido nucleico se refiere a los restos que coinciden en dos secuencias cuando se alinean para una máxima correspondencia. La comparación de la longitud de identidad de secuencia puede ser sobre un tramo de al menos aproximadamente nueve nucleótidos, normalmente al menos aproximadamente 18 nucleótidos, más normalmente al menos aproximadamente 24 nucleótidos, típicamente al menos aproximadamente 28 nucleótidos, más típicamente al menos aproximadamente 32 nucleótidos y preferentemente al menos aproximadamente 36, 48 o más nucleótidos. Existen diversos algoritmos diferentes conocidos en la técnica que pueden utilizarse para medir la identidad de secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótidos pueden compararse utilizando FASTA, Gap o Bestfit, que son programas del paquete informático de Wisconsin Versión 10.0, Grupo Genetics Computer (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, que incluyen, por ejemplo, los programas FASTA2 y FASTA3, proporcionan alineamientos y porcentajes de identidad de secuencia de las regiones de mejor solapamiento entre la secuencia problema y la investigada (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.* 266:227-258 (1996); Pearson, *J. Mol. Biol.* 276:71-84 (1998). A menos que se especifique otra cosa, para un programa o algoritmo particular se utilizan parámetros por defecto. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de secuencia entre secuencias de ácido nucleico puede determinarse utilizando FASTA con sus parámetros por defecto (un tamaño de palabra de 6 y el factor NOPAM para la matriz de puntuación) o utilizando Gap con sus parámetros por defecto como se proporciona en GCG Versión 6.1.

A menos que se especifique en contra, una referencia a una secuencia de nucleótidos incluye su complemento. Por tanto, una referencia a un ácido nucleico que tiene una secuencia particular debe entenderse que incluye su cadena complementaria, con su secuencia complementaria.

En la técnica de la biología molecular, los investigadores utilizan indistintamente las expresiones "porcentaje de identidad de secuencia", "porcentaje de similitud de secuencia", y "porcentaje de homología de secuencia". En la presente memoria descriptiva, estas expresiones tendrán el mismo significado solo con respecto a las secuencias de ácido nucleico.

La expresión "similitud sustancial" o "similitud sustancial de secuencia", cuando se hace referencia a un ácido nucleico o fragmento del mismo, significa que cuando se alinean de manera óptima con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas con otro ácido nucleico (o con su cadena complementaria), existe una identidad de secuencia de nucleótidos de al menos aproximadamente 85 %, preferentemente al menos aproximadamente 90 % y más preferentemente al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de las bases de nucleótidos, medida por cualquier algoritmo de identidad de secuencia bien conocido, tal como FASTA, BLAST o Gap como se ha indicado anteriormente.

Aplicada a polipéptidos, la expresión "identidad sustancial" significa que cuando dos secuencias peptídicas se alinean óptimamente, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT utilizando pesos de hueco por defecto, comparten una identidad de secuencia de al menos 70, 75 u 80 por ciento, preferentemente una identidad de secuencia de al menos 90 o 95 por ciento y más preferentemente una identidad de secuencia de al menos 97, 98 o 99 por ciento. Preferentemente, las posiciones de restos que no son idénticos se diferencian por sustituciones de aminoácidos conservativas. Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en la que un resto de aminoácido se sustituye por otro resto de aminoácido que tiene un grupo R en la cadena lateral con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácidos conservativa no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en los que dos o más secuencias de aminoácidos difieran entre sí por sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencia o grado de similitud puede ajustarse al alza para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Los expertos en la técnica conocen bien medios para realizar este ajuste. Véase, por ejemplo, Pearson, *Methods Mol. Biol.* 243:307-31 (1994). Como ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares se incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales alifáticas hidroxiladas: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: ácido aspártico y ácido glutámico; y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservativos preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina.

Como alternativa, un reemplazo conservativo es cualquier cambio que tiene un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 descrita en Gonnet y col., *Science* 256:1443-45 (1992). Un reemplazo

“moderadamente conservativo” es cualquier cambio que tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

La similitud de secuencia para polipéptidos, también denominada identidad de secuencia, se mide típicamente utilizando programas informáticos de análisis de secuencia. Los programas informáticos de análisis de proteínas emparejan secuencias similares utilizando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, deleciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones de aminoácidos conservativas. Por ejemplo, GCG contiene programas tales como “Gap” y “Bestfit” que pueden utilizarse con parámetros por defecto para determinar la homología de secuencia o la identidad de secuencia entre polipéptidos muy relacionados, tales como polipéptidos homólogos de especies de organismos diferentes o entre una proteína de tipo silvestre y una muteína de la misma. Véase, por ejemplo, la Versión 6.1 de GCG. Las secuencias polipeptídicas también pueden compararse utilizando FASTA, un programa en GCG Versión 6.1, que utiliza parámetros por defecto o recomendados. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineamientos y porcentajes de identidad de secuencia de las regiones que mejor solapan entre las secuencias problema y de búsqueda (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000)). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia de la invención con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente blastp o tblastn, que utilizan parámetros por defecto. Véase, por ejemplo, Altschul y col., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); Altschul y col., *NucleicAcids Res.* 25:3389-402 (1997).

La longitud de las secuencias polipeptídicas comparadas por homología generalmente tendrán al menos aproximadamente 16 restos de aminoácidos, normalmente al menos aproximadamente 20 restos, más normalmente al menos aproximadamente 24 restos, típicamente al menos aproximadamente 28 restos y preferentemente más de aproximadamente 35 restos. Cuando se busca una base de datos que contiene secuencias de una gran cantidad de organismos diferentes, es preferible comparar secuencias de aminoácidos.

Como se usa en el presente documento, los términos “identificador” o “identificado” se refieren a la incorporación de otra molécula en el anticuerpo. En una realización, el identificador es un marcador detectable, por ejemplo, la incorporación de un aminoácido marcado con radioactividad o la unión a un polipéptido de restos biotinilados que pueden detectarse con avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse mediante procedimientos ópticos o colorimétricos). En otra realización, el identificador o marcador puede ser terapéutico, por ejemplo, un fármaco conjugado o una toxina. En la técnica se conocen y pueden utilizarse diversos procedimientos de identificación de polipéptidos y glucoproteínas. Como ejemplos de identificadores para polipéptidos se incluyen, pero sin limitación, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), etiquetas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos lantánidos), identificadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, grupos biotinilados, epítopes polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas epitópicas), agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio, toxinas, tales como, toxina tosferínica, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi-antracín-diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. En algunas realizaciones, los identificadores están unidos por brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir un posible impedimento estérico.

El término paciente incluye sujetos humanos y animales tratados por un veterinario.

A lo largo de la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la palabra “comprende” o variaciones tales como “que comprende” o “comprendiendo” se entenderá que implica la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicado pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros.

Anticuerpos anti-CD40 humanos y su caracterización

Los anticuerpos humanos evitan determinados problemas asociados con anticuerpos que poseen regiones variables y/o constantes no humanas (por ejemplo roedores). Dichos problemas incluyen la rápida eliminación de los anticuerpos o respuesta inmunitaria contra el anticuerpo. Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona anticuerpos anti-CD40 humanizados como se caracteriza en las reivindicaciones. En otra realización, la invención proporciona anticuerpos anti-CD40 humanos como se caracteriza en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD40 humanos se producen inmunizando a un roedor cuyo genoma comprende genes de inmunoglobulina humana de manera que el roedor produce anticuerpos humanos. Se espera que los anticuerpos anti-CD40 humanos minimicen las respuestas inmunogénicas y alérgicas intrínsecas contra anticuerpos monoclonales (Mabs) no humanos o no humanos derivatizados y por tanto aumenten la eficacia y seguridad de los anticuerpos administrados. Cabe esperar que el uso de anticuerpos completamente humanos proporcione una ventaja sustancial en el tratamiento de enfermedades humanas crónicas y recurrentes, tales como inflamación y cáncer, que pueden requerir administraciones repetidas de anticuerpos.

5 La invención proporciona un anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD40 humano activador y la línea celular de hibridoma que lo produce. También se describen diez anticuerpos monoclonales anti-CD40 humanos activadores adicionales y las líneas celulares de hibridoma que los producen. La Tabla A enumera los identificadores de secuencia (SEC ID Nos:) de los ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesada y ligera de longitud completa (incluyendo la secuencia líder), las secuencias de aminoácidos deducidas correspondientes de longitud completa y la secuencia de aminoácidos de nucleótidos y deducida de las regiones variables de cadena pesada y ligera.

Tabla A

Anticuerpos anti-CD40 humanos								
mAb	Identificador de secuencia (SEC ID N°)							
	Región variable				Longitud completa			
	Pesada		Ligera		Pesada		Ligera	
	ADN	Proteína	ADN	Proteína	ADN	Proteína	ADN	Proteína
3.1.1	1	2	3	4	5	6	7	8
7.1.2	9	10	11	12	13	14	15	16
10.8.3	17	18	19	20	21	22	23	24
15.1.1	25	26	27	28	29	30	31	32
21.2.1	33	34	35	36	37	38	39	40
21.4.1	41	42	43	44	45	46	47	48
22.1.1	49	50	51	52	53	54	55	56
23.5.1	57	58	59	60	61	62	63	64
23.28.1	65	66	67	68	69	70	71	72
23.29.1	73	74	75	76	77	78	79	80
24.2.1	81	82	83	84	85	86	87	88

En el presente documento también se describe el mAb anti-CD40 humano, 23.23.1 y la línea celular de hibridoma que lo produce.

10 En el presente documento también se describen variantes de cadena pesada y/o ligera de determinados mAb anti-CD40 humanos indicados anteriormente, que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos. La invención proporciona dos cadenas pesadas variantes del mAb 3.1.1. En una, la alanina en el resto 78 está cambiada por treonina. En la otra, la alanina en el resto 78 está cambiada por treonina, y las valinas en los restos 88 y 97 están cambiadas por alaninas. La invención también proporciona una cadena ligera variante del mAb 3.1.1 en la que la leucina en el resto 4 y la leucina en el resto 83 están cambiadas por metionina y valina, respectivamente. La combinación con una cadena ligera o pesada variante con una cadena ligera o pesada de tipo silvestre, respectivamente se denomina cadena mutante. Por tanto, un anticuerpo que contiene una cadena ligera de tipo silvestre y una cadena pesada que comprende la mutación de alanina por treonina en el resto 78 se denomina 3.1.1H-A78T. Sin embargo, en otras realizaciones de la invención, se incluyen anticuerpos que contienen cualquier combinación de una cadena pesada variante y la cadena ligera variante de 3.1.1.

25 En el presente documento también se describe una variante de la cadena pesada del mAb 22.1.1 en la que la cisteína en el resto 109 está cambiada por una alanina. Un anticuerpo monoclonal que comprende la cadena pesada variante y la cadena ligera de 22.1.1 se denomina mAb 22.1.1 H-C109A. En el presente documento también se describen dos cadenas pesadas variantes y una cadena ligera variante del mAb 23.28.1. En una variante de cadena pesada, el ácido aspártico en el resto 16 está cambiado por ácido glutámico. Un mAb que comprende la cadena pesada variante y la cadena ligera de 23.28.1 se denomina 23-28.1 H-D16E. La memoria descriptiva también describe una variante de cadena ligera de 23.28.1 en la que la cisteína en el resto 92 está cambiada por una alanina. Un mAb que comprende la cadena pesada de 23.28.1 y la cadena ligera variante se denomina 23.28.1 L C92A. En el presente documento también se describen los mAb que comprenden cualquiera de las variantes de cadena pesada de 23.28.1 con la variante de cadena ligera de 23.28.1.

La cadena ligera producida por el hibridoma 23.29.1 contiene una mutación en la región constante en el resto 174. La cadena ligera producida por el hibridoma tiene arginina en esta posición en lugar de la lisina canónica. Por consiguiente, la presente memoria descriptiva también describe una cadena ligera de 23.29.1 con la lisina canónica en el resto 174 y un mAb, denominado 2329.1L-R174K, que comprende la cadena pesada y la cadena ligera variante de 23.29.1

En el presente documento se describen los anticuerpos anti-CD40, 3.1.1, 3.1.1HA78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R17 K y 24.2.1. En una realización preferida el anticuerpo anti-CD40 es 21.4.1. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD40 comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC ID No: 8,16, 34, 32, 40, 56, 64, 72, 80, 88, 94,100 o 102 o la región variable de la misma, o que codifica una secuencia de ácido nucleico seleccionada de la SEC ID N°: 7,15, 23, 31, 39, 55, 63, 71, 79, 87, 93, 99 o 101. En una realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 48 o la región variable de la misma, o que codifica la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 47. En algunos casos descritos en el presente documento, el anticuerpo anti-CD40 comprende una cadena ligera que comprende al menos la CDR2 de uno de los anticuerpos enumerados, una de las secuencias de aminoácidos identificadas anteriormente (como se muestra en las Figuras 1A-1C y 2A-2C) o codificadas por una de las secuencias de ácido nucleico identificadas anteriormente. En otro caso descrito en el presente documento, la cadena ligera comprende adicionalmente una CDR1 y CDR3 seleccionada independientemente de una región variable de cadena ligera que comprende no más de diez aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por un gen V_K A3/A19, L5 o A27 de línea germinal, o comprende una CDR1 y CDR3 seleccionada independientemente de una CDR1 y una CDR3 de (1) un anticuerpo seleccionado de 3.1.1, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3,15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K o 24.2.1; (2) la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 94, 100 o 102 o (3) codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 3, 11, 19, 27, 35, 43, 51, 59, 67, 75, 83, 93, 99 o 101.

En otro caso descrito en el presente documento, el anticuerpo anti-CD40 comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEC ID Nos: 6, 14, 22, 30, 38, 54, 62, 70, 78 o 86 o la región variable de la misma o codificada por una secuencia de ácido nucleico seleccionada de las SEC ID Nos: 5, 13, 21, 29, 37, 53, 61, 69, 77 u 85. En una realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 46 o la región variable de la misma, o que codifica la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 45. En algunos casos descritos en el presente documento, el anticuerpo anti-CD40 comprende una cadena pesada que comprende al menos la CDR3 de uno de los anticuerpos enumerados, una de las secuencias de aminoácidos indicadas anteriormente (como se muestra en las Figuras 1A-1C y 2A-2C) o que codifica una de las secuencias de ácido nucleico identificadas anteriormente. En otro caso descrito en el presente documento, la cadena pesada comprende adicionalmente una CDR1 y CDR2 seleccionada independientemente de una región variable de cadena pesada que comprende no más de dieciocho aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por un gen V_H 3-30+, 4-59, 1-02, 4.35 o 3-30.3 de la línea germinal, o que comprende una CDR1 y CDR2 seleccionada independientemente de una CDR1 y CDR2 de (1) un anticuerpo seleccionado de 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.29.1 y 24.2.1; (2) la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96 o 98 o (3) codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 91, 95 o 97. En otra realización, el anticuerpo anti-CD40 comprende una cadena pesada y una cadena ligera del anticuerpo 21.4.1 como se ha definido anteriormente.

Como se usa en el presente documento, el anticuerpo 3.1.1H-A78T es idéntico al 3.1.1 salvo que el resto 78 de la cadena pesada es treonina en lugar de alanina. De manera similar, en el anticuerpo 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, el resto 78 está cambiado a A y los restos 88 y 97 están cambiados de valina a alanina en la cadena pesada. El anticuerpo 3.1.1L-L4M-L83V es idéntico al 3.1.1 excepto que el resto 4 es metionina en lugar de leucina y el resto 83 es valina en lugar de leucina en la cadena ligera. El anticuerpo 22.1.1H-C109A es idéntico al 22.1.1 excepto que el resto 109 de la cadena pesada está cambiado de una cisteína a una alanina. Los anticuerpos 23.28.1H-D16E y 23.28.1L-C92A son idénticos al 23.28.1 excepto que el resto 16 de la cadena pesada está cambiado de aspartato a glutamato y resto 92 de la cadena ligera está cambiado de cisteína a alanina, respectivamente. El anticuerpo 23.29.1L-R174K es idéntico al 23.29.1 salvo que el resto 174 de la cadena ligera está cambiado de arginina a lisina.

Clase y subclase de los anticuerpos anti-CD40

La clase y subclase de los anticuerpos anti-CD40 puede determinarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. En general, la clase y subclase de un anticuerpo puede determinarse utilizando anticuerpos que son específicos para una clase y subclase particular de anticuerpo. Dichos anticuerpos se encuentran disponibles en el comercio. La clase y subclase puede determinarse por ELISA, o por transferencia de Western, así como mediante otras técnicas. Como alternativa, la clase y subclase puede determinarse secuenciando toda o una parte de los dominios constantes de las cadenas pesada y/o ligera de los anticuerpos, comparando sus secuencias de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos conocidas de diversas clases y subclases de inmunoglobulinas, y determinado la clase y subclase de los anticuerpos.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 es un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo anti-CD40 puede ser una IgG, una IgM, una IgE, una IgA o una molécula IgD. En una realización preferida, el anticuerpo anti-CD40 es una IgG y es una subclase de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En otra realización preferida, los anticuerpos anti-CD40 son de la subclase de IgG2.

5 Selectividad de especies y molecular

En otro aspecto de la invención, los anticuerpos anti-CD40 demuestran selectividad tanto de especies como de molécula. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 se une al CD40 de primates y de ser humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 se une al CD40 de ser humano, de mono cinomolgo o rhesus. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 no se une al CD40 de ratón, rata, perro o conejo. Siguiendo lo indicado en la memoria descriptiva, utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica, puede determinarse la selectividad de especies del anticuerpo anti-CD40. Por ejemplo, utilizando transferencia de Western, FACS, ELISA o RIA puede determinarse la selectividad de especies. (Véase, por ejemplo, el Ejemplo IV).

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 tiene una selectividad por CD40 que es más de 100 veces mayor que su selectividad por RANK (activador de receptores del factor nuclear-kappa B), 4-1BB (CD137), TNFR-1 (Receptor del Factor de Necrosis Tumoral 1) y TNFR-2 (Receptor del Factor de Necrosis Tumoral 2). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 no presenta ninguna unión específica apreciable con ninguna otra proteína que no sea CD40. Siguiendo lo indicado en la memoria descriptiva, utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica, puede determinarse la selectividad del anticuerpo anti-CD40 por CD40. Por ejemplo, la selectividad puede determinarse utilizando transferencia de Western, FACS, ELISA o RIA. (Véase, por ejemplo, el Ejemplo V).

20 Identificación de epítopes de CD40 reconocidos por el anticuerpo anti-CD40

Adicionalmente, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-CD40 humano que se une a CD40 y que compite en cruzado con y/o se une con el mismo epítipo y/o se une a CD40 con la misma K_D que el anticuerpo anti-CD40 humano 21.4.1. En este aspecto, en el presente documento también se describen los anticuerpos 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 2328.1H-D16E, 2328.1L-C92A, 2329.1, 23.29.1L-R174K y 24.2.1. La invención también proporciona un anticuerpo anti-CD40 humano que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:42. En este aspecto, en el presente documento también se describen las SEC ID Nos: 2, 10, 18, 26, 34, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96 o 98. La invención también proporciona un anticuerpo anti-CD40 humano que comprende una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 44. En este aspecto, en el presente documento también se describen las SEC ID Nos: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 94, 100 o 102.

Utilizando cualquier procedimiento conocido en la técnica puede determinarse si un anticuerpo se une al mismo epítipo o compite en cruzado por la unión con un anticuerpo anti-CD40. En una realización, puede permitirse que el anticuerpo anti-CD40 de la invención se una a CD40 en condiciones saturantes y después medir la capacidad del anticuerpo de ensayo para unirse a CD40. Si el anticuerpo de ensayo puede unirse a CD40 al mismo tiempo que el anticuerpo anti-CD40, entonces el anticuerpo de ensayo se une a un epítipo diferente al del anticuerpo anti-CD40. Sin embargo, si el anticuerpo de ensayo no puede unirse a CD40 al mismo tiempo, entonces el anticuerpo de ensayo se une al mismo epítipo, a un epítipo solapante, o a un epítipo que está muy próximo al epítipo unido al anticuerpo anti-CD40 humano. Este experimento puede realizarse utilizando ELISA, RIA, FACS y resonancia de plasmón superficial. (Véase, por ejemplo, el Ejemplo VI). En una realización preferida, el experimento se realiza utilizando resonancia de plasmón superficial. En una realización más preferida, se utiliza BIAcore.

Afinidad de unión de los anticuerpos anti-CD40 por CD40

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-CD40 se une a CD40 con alta afinidad. Como se describe en el presente documento, el anticuerpo anti-CD40 se une a CD40 con una K_D de 2×10^{-8} M o menor. En el presente documento también se describe que el anticuerpo se une a CD40 con una K_D de 2×10^{-9} , 2×10^{-10} , $4,0 \times 10^{-11}$ M o menor. En una realización preferida, el anticuerpo se une a CD40 con una K_D de 4×10^{-10} M o menor. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a CD40 sustancialmente con la misma K_D que la del anticuerpo 21.4.1. En este aspecto, en el presente documento también se describen los anticuerpos 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K o 24.2.1. En otra realización preferida, el anticuerpo se une a CD40 sustancialmente con la misma K_D que la de un anticuerpo que comprende una CDR2 de una cadena ligera, y/o una CDR3 de una cadena pesada del anticuerpo 21.41. En este aspecto, en el presente documento también se describen los anticuerpos 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.18.1, 23.28.1H-D16E, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K y 24.2.1. En otra realización aún preferida, el anticuerpo se une a CD40 sustancialmente con la misma K_D que la de un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 42 o que comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 44.

En este aspecto, en el presente documento también se describen anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nos: 2, 10, 18, 26, 34, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96 o 98 o que comprende una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4, 12, 20, 28, 36, 52, 60, 68, 76, 84, 94, 100 o 102. En otra realización preferida el anticuerpo que se une a CD40 sustancialmente con la misma K_D que la de un anticuerpo que comprende una CDR2 de una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 44 o una CDR3 de una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 42. En este aspecto, en el presente documento también se describen anticuerpos que comprenden una CDR2 de una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4, 12, 20, 28, 36, 52, 60, 68, 76, 84, 94, 100 o 102 o una CDR3 de una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, 10, 18, 26, 34, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96 o 98.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 tiene una constante de disociación baja. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 tiene una K_{off} de $2,0 \times 10^{-4}$ o menor. En algunas realizaciones, la K_{off} es de $2,0 \times 10^{-7}$ o menor. En algunas realizaciones, la K_{off} es sustancialmente la misma que la de un anticuerpo reivindicado en el presente documento. En este aspecto, en el presente documento también se describen los anticuerpos 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K y 24.2.1. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a CD40 sustancialmente con la misma K_{off} que la de un anticuerpo que comprende una CDR3 de una cadena pesada o una CDR2 de una cadena ligera del anticuerpo 21.4.1. En este aspecto, en el presente documento también se describen anticuerpos 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-L44-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 12.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K y 24.2.1. En algunas realizaciones el anticuerpo se une a CD40 sustancialmente con la misma K_{off} que la de un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 42 o que comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 44. En este aspecto, en el presente documento también se describen anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, 10, 18, 26, 34, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96 o 98 o que comprenden una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4, 12, 20, 28, 36, 52, 60, 68, 76, 84, 94, 100 o 102. En otra realización preferida, el anticuerpo se une a CD40 sustancialmente con la misma K_{off} que la de un anticuerpo que comprende una CDR2 de una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 44 o una CDR3 de una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 46. En este aspecto, en el presente documento también se describen anticuerpos que comprenden una CDR2 de una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4, 12, 20, 28, 36, 52, 60, 68, 76, 84, 94, 100 o 102 o una CDR3 de una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 6, 14, 22, 30, 38, 54, 62, 70, 78, 86, 90, 92, 96 o 98.

La afinidad de unión y la constante de disociación de un anticuerpo anti-CD40 contra CD40 puede determinarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. La afinidad de unión puede medirse mediante ensayos ELISA competitivos, ensayos RIA o de resonancia de plasmón superficial, tal como BIAcore. La constante de disociación también puede medirse por resonancia de plasmón superficial. Preferentemente, la afinidad de unión y la constante de disociación se miden por resonancia de plasmón superficial. Más preferentemente, la afinidad de unión y constante de disociación se miden utilizando un BIAcore™. Véase, por ejemplo, el Ejemplo XIV.

Uso de genes de cadena ligera y pesada

Un anticuerpo anti-CD40 de la invención puede comprender una cadena ligera kappa humana o lambda humana o una secuencia de aminoácidos derivada de la misma. En algunas realizaciones que comprenden una cadena ligera kappa, el dominio variable de cadena ligera (V_L) está codificado en parte por un gen V_K A3/A19 (DPK-15), L5 (DP5) o A27 (DPK-22) humano.

En algunos casos descritos en el presente documento, el V_L del anticuerpo anti-CD40 contiene una o más sustituciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. En algunos de estos casos, el V_L del anticuerpo anti-CD40 comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. En algunos casos, una o más de las sustituciones de la línea germinal se encuentran en las regiones CDR de la cadena ligera. En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos en relación con la línea germinal se encuentran en las mismas posiciones que las de las sustituciones relativas a la línea germinal en el V_L del anticuerpo 21.4.1. En este aspecto, en el presente documento también se describen anticuerpos 3.1.1, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K y 24.2.1. Por ejemplo, el V_L del anticuerpo anti-CD40 puede contener una o más sustituciones de aminoácidos en comparación con la línea germinal encontrada en el anticuerpo 21.4.1, y otras sustituciones de aminoácidos en comparación con la línea germinal encontradas en el anticuerpo 10.8.3 que utiliza el mismo gen V_K que el anticuerpo 21.4.1. En algunos casos descritos en el presente documento, los cambios de aminoácidos se producen en una o más de las mismas posiciones pero implican una mutación diferente que la del anticuerpo de referencia.

En algunos casos descritos en el presente documento, los cambios de aminoácidos en relación con la línea germinal se producen en una o más de las mismas posiciones que las de cualquiera de los V_L de los anticuerpos 3.1.1, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K y 24.2.1, pero los cambios pueden representar sustituciones de aminoácidos conservativas en dicha posición (o posiciones) en relación con el aminoácido en el anticuerpo de referencia. Por ejemplo, si en uno de estos anticuerpos se cambia una posición particular en relación con la línea germinal y es glutamato, en esa posición puede sustituirse el aspartato, de manera conservativa. De manera similar, si una sustitución de aminoácidos comparada con la línea germinal es serina, puede sustituirse la treonina, de manera conservativa, por serina en esa posición. Anteriormente se han comentado las sustituciones de aminoácidos conservativas.

En algunas realizaciones, la cadena ligera del anticuerpo anti-CD40 humano comprende la secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos del V_L del anticuerpo 21.4.1 (SEC ID N°: 44). En este aspecto, en el presente documento también se describen las secuencias de aminoácidos del V_L del anticuerpo 3.1.1 (SEC ID N°: 4), 3.1.1L-L4M-L83V (SEC ID N°: 94), 7.1.2 (SEC ID N°: 12), 10.8.3 (SEC ID N°: 20), 15.1.1 (SEC ID N°: 28), 21.2.1 (SEC ID N°: 36), 22.1.1 (SEC ID N°: 52), 23.5.1 (SEC ID N°: 60), 23.28.1 (SEC ID N°: 68), 23.28.1L-C92A (SEC ID N°: 100), 23.29.1 (SEC ID N°: 76), 23.29.1L-R174K (SEC ID N°: 102) o 24.2.1 (SEC ID N°: 84). En el presente documento también se describen dichas secuencias de aminoácidos que tienen hasta 1, 2, 3, 4, 6, 8 o 10 sustituciones de aminoácidos conservativas y/o un total de hasta 3 sustituciones de aminoácidos no conservativas.

En algunos casos descritos en el presente documento, la cadena ligera del anticuerpo anti-CD40 comprende al menos la CDR2 de cadena ligera y también puede comprender las regiones CDR1 y CDR3 de una secuencia de la línea germinal, como se describe en el presente documento. En otro caso descrito en el presente documento, la cadena ligera puede comprender una CDR1 y CDR2 de un anticuerpo seleccionado independientemente de 3.1.1, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1L-C92A, 23.29.1 y 24.2.1, o regiones CDR cada una con menos de 8, menos de 6, menos de 4 o menos de 3 sustituciones de aminoácidos conservativas y/o un total de tres o menos sustituciones de aminoácidos no conservativas. En otros descritos en el presente documento, la cadena ligera del anticuerpo anti-CD40 comprende al menos la CDR2 de ligera y también puede comprender las regiones CDR1 y CDR3, seleccionada cada una de ellas independientemente de las regiones CDR1 y CDR3 de un anticuerpo que tiene una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEC ID Nos: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 94 o 100, o codificada por una molécula de ácido nucleico seleccionada de las SEC ID Nos: 3, 11, 19, 27, 35, 43, 51, 59, 67, 75, 83, 93 o 99.

Con respecto a la cadena pesada, en algunos casos descritos, la región variable de la secuencia de aminoácidos de cadena pesada está codificada en parte por un gen V_H 3-30+, V_H 4-59 - V_H 1-02, V_H 4.35 o V_H 3-30,3 humano. En algunos casos descritos en el presente documento, el V_H del anticuerpo anti-CD40 contiene una o más sustituciones, deleciones o inserciones (adiciones) de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. En algunos casos descritos en el presente documento, el dominio variable de la cadena pesada comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 mutaciones de la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. En algunos casos descritos en el presente documento, la mutación (o mutaciones) son sustituciones no conservativas en comparación con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. En algunos casos descritos en el presente documento, las mutaciones están en las regiones CDR de la cadena pesada. En algunas realizaciones, los cambios de aminoácidos se realizan en las mismas posiciones que las mutaciones de la línea germinal en el V_H del anticuerpo 21.4.1. En el presente documento también se describen cambios de aminoácidos realizados en aspecto en uno cualquiera o más de los V_H de los anticuerpos 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-Y88A-V97A, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.29.1 y 24.2.1. En otros casos descritos en el presente documento, los cambios de aminoácidos se realizan en una o más de las mismas posiciones pero implica una mutación diferente a la del anticuerpo de referencia.

En algunas realizaciones, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos del dominio variable (V_H) del anticuerpo 21.4.1 (SEC ID N°: 42). En este aspecto, en el presente documento también se describen los anticuerpos 3.1.1 (SEC ID N°: 2), 3.1.1H-A78T (SEC ID N°: 90), 3.1.1H-A78T-V88A-V97A (SEC ID N°: 92), 7.1.2 (SEC ID N°: 10), 10.8.3 (SEC ID N°: 18), 15.1.1 (SEC ID N°: 26), 21.2.1 (SEC ID N°: 34), 22.1.1 (SEC ID N°: 50), 22.1.1H-C109A (SEC ID N°: 96), 23.5.1 (SEC ID N°: 58), 23.28.1 (SEC ID N°: 66), 23.28.1H-D16E (SEC ID N°: 98), 23.29.1 (SEC ID N°: 74) y 24.2.1 (SEC ID N°: 82). En este aspecto, en el presente documento también se describen secuencias de aminoácidos que tienen hasta 1, 2, 3, 4, 6, 8 o 10 sustituciones de aminoácidos conservativas y/o un total de hasta 3 sustituciones de aminoácidos no conservativas.

En algunas realizaciones, la cadena pesada comprende las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 21.4.1. En este aspecto, en el presente documento también se describen los anticuerpos 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.29.1 y 24.2.1 (como se muestra en las Figs. 1H-1D o 2D-2H). En algunos casos descritos en el presente documento cada una de dichas regiones CDR tiene menos de 8, menos de 6, menos de 4, o menos de 3 sustituciones de aminoácidos conservativas y/o un total de tres o menos sustituciones de aminoácidos no conservativas.

En algunos casos descritos en el presente documento, la cadena pesada comprende una CDR3, y también puede comprender las regiones CDR1 y CDR2 de una secuencia de línea germinal, como se ha descrito anteriormente, o puede comprender una CDR1 y CDR2 de un anticuerpo, cada una de ellas seleccionada independientemente de un anticuerpo que comprende la cadena pesada de un anticuerpo seleccionado de 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1 0.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.29.1 y 24.2.1. En otro caso descrito en el presente documento, la cadena pesada comprende una CDR3, y también puede comprender las regiones CDR1 y CDR2, cada una de ellas seleccionada independientemente de una región CDR1 y CDR2 de una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEC ID Nos: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96 o 98 (como se muestra en las Figs. 1D-1H o Figs. 2D-2H) o codificadas por una secuencia de ácido nucleico seleccionada de las SEC ID Nos: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 91, 95 o 97. En otra realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada del anticuerpo 21.4.1, como se describe anteriormente y una cadena ligera del anticuerpo 21.4.1, como se describe anteriormente.

Un tipo de sustitución de aminoácidos que puede realizarse es cambiar en el anticuerpo una o más cisteínas que pueden reaccionar químicamente con otro resto, tal como, pero sin limitación, alanina o serina. En un caso descrito en el presente documento, la sustitución de cisteína se realiza en una región marco conservada de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. En otro caso, la cisteína está en una región no canónica del anticuerpo. Otro tipo de sustitución de aminoácido que puede realizarse en el anticuerpo, es cambiar cualquiera de los posibles sitios proteolíticos, particularmente los que están en una región marco conservada de un dominio variable, en el dominio constante de un anticuerpo, o en una región no canónica del anticuerpo. La sustitución de restos de cisteína y la retirada de sitios proteolíticos puede disminuir el riesgo de que se produzca cualquier heterogeneidad en el producto de anticuerpo y por tanto aumentar su homogeneidad. Otro tipo de sustitución de aminoácido es eliminar pares asparagina-glicina, que forman posibles sitios de desamidación, alterando uno a ambos restos. Esto se realiza preferentemente en regiones marco conservadas, el dominio constante o regiones no canónicas del anticuerpo.

Activación de CD40 por el anticuerpo anti-CD40

El anticuerpo anti-CD40 de la invención es un anticuerpo activador, es decir, un agonista de CD40. Un anticuerpo activador amplifica o sustituye los efectos de CD40L en CD40. En algunos casos descritos en el presente documento, el anticuerpo activador es esencialmente un mimético de CD40L y compite con CD40L por la unión a CD40. En algunas realizaciones, el anticuerpo no compite con CD40L por la unión a CD40, pero amplifica el efecto de unión de CD40L a CD40. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 activa CD40 en presencia o en ausencia de CD40L.

Inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* por los anticuerpos anti-CD40

El anticuerpo anti-CD40 de la invención inhibe la proliferación de células tumorales *in vitro* o el crecimiento tumoral *in vivo*.

En algunas realizaciones, el anticuerpo inhibe el crecimiento tumoral al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %. En algunas realizaciones, el anticuerpo inhibe el crecimiento tumoral un 75 %. En una realización, la inhibición del crecimiento tumoral es detectable 14 días después del tratamiento inicial con el anticuerpo. En otras realizaciones, la inhibición del crecimiento tumoral es detectable 7 días después del tratamiento inicial con el anticuerpo. En algunos casos descritos en el presente documento, al animal se le administra otro agente antineoplásico con el anticuerpo anti-CD40. Como se describe en el presente documento, el agente antineoplásico inhibe adicionalmente el crecimiento tumoral. Como se describe en el presente documento, el agente antineoplásico puede ser adriamicina o taxol. En algunos casos descritos en el presente documento, la co-administración de un agente antineoplásico y el anticuerpo anti-CD40 inhibe el crecimiento tumoral al menos un 50 %, después de un período de tiempo de 22-24 días desde el inicio del tratamiento en comparación con el crecimiento tumoral de un animal no tratado.

Inducción de la apoptosis por los anticuerpos anti-CD40

En el presente documento también se describe un anticuerpo anti-CD40 que induce la muerte celular de células CD40 positivas. En algunos casos descritos en el presente documento, el anticuerpo produce la apoptosis de células CD40 positivas bien *in vitro* o *in vivo*.

Potenciación de la expresión de moléculas de superficie celular

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 potencia la expresión de moléculas de superficie de linfocitos B, incluyendo, pero sin limitación, ICAM, MHC-II, B7-2, CD71, CD23 y CD83. En algunas realizaciones, 1 µg/ml del anticuerpo potencia al menos 2 veces, o más preferentemente al menos 4 veces, la expresión de ICAM en un ensayo de regulación positiva de moléculas de superficie de linfocitos B de sangre entera. En algunas realizaciones, 1 µg/ml del anticuerpo potencia al menos 2 veces, o más preferentemente al menos 3 veces, la expresión de MHC-II en un ensayo de regulación positiva de moléculas de superficie de linfocitos B en sangre entera. En algunas

realizaciones, 1 µg/ml del anticuerpo potencia al menos 2 veces, o más preferentemente al menos 5 veces, la expresión de CD23 en un ensayo de regulación positiva de moléculas de superficie de linfocitos B en sangre entera. Véase, por ejemplo, el Ejemplo VII, Tabla 25.

5 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 potencia la expresión de moléculas de superficie de células dendríticas, incluyendo, pero sin limitación, MHC-II, ICAM, B7-2, CD83 y B7-1. En algunas realizaciones el intervalo de regulación positiva es similar al intervalo de regulación negativa observado en linfocitos B. Véanse, por ejemplo, las Tablas 25 y 26 más adelante. En algunas realizaciones, el anticuerpo regula positivamente de manera preferencial la expresión de moléculas de superficie de células dendríticas, tales como B7-2 y MHC-11, en comparación con la expresión de linfocitos B de estas moléculas. Véase, por ejemplo, la Tabla 27.

10 Potenciación de secreción de citocinas celulares

En algunas realizaciones, el anticuerpo aumenta potencia la secreción celular de citocinas, incluyendo, pero sin limitación, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-23.

15 En algunas realizaciones el anticuerpo potencia la secreción de citocinas por células dendríticas y monocitos adherentes. En algunas realizaciones la producción de citocinas se potencia adicionalmente por co-estimulación con uno o más LPS, IF- γ o IL-1 β . En otro aspecto más de la invención, la co-estimulación del anticuerpo con LPS potencia la producción de IL-12p70 en un ensayo con células dendríticas con un valor CE₅₀ de aproximadamente 0,48 µg/ml. En algunas realizaciones, el anticuerpo potencia la producción de IL-12p40 en células dendríticas con un valor CE₅₀ de aproximadamente 0,21 µg/ml. (Véase, por ejemplo, el Ejemplo VIII).

20 En algunas realizaciones, el anticuerpo potencia la secreción de IFN-gamma por linfocitos T en un ensayo alogénico con linfocitos T/células dendríticas, como se describe en el Ejemplo VIII. En algunas realizaciones, el anticuerpo potencia la secreción de IFN-gamma en un ensayo alogénico con linfocitos T/células dendríticas con un valor CE₅₀ de aproximadamente 0,3 µg/ml. En algunas realizaciones, el anticuerpo potencia la secreción de IFN-gamma en un ensayo alogénico de linfocitos T/células dendríticas con un valor CE₅₀ de aproximadamente 0,2 µg/ml. En una realización, el anticuerpo potencia la secreción de IFN-gamma en un ensayo alogénico con linfocitos T/células dendríticas con un valor CE₅₀ de aproximadamente 0,03 µg/ml.

Procedimientos de producción de anticuerpos y líneas celulares productoras de anticuerpos.

30 Como se describe en el presente documento los anticuerpos humanos de la invención pueden producirse inmunizando a un animal no humano, que comprende en su genoma alguno o todos los locus de la cadena ligera y cadena pesada de inmunoglobulina humana, con un antígeno CD40. Preferentemente, el animal no humano es un animal Xenomouse™.

35 Los ratones Xenomouse™ son cepas de ratón modificadas genéticamente que comprenden fragmentos grandes de locus de cadena ligera y cadena pesada de inmunoglobulina humana y no producen anticuerpos de ratón. Véase, por ejemplo, Green y col, Nature Genetics 7:13-21 (1994) y las patentes de Estados Unidos 5.916.771, 5.939.598, 5.985.615, 5.998.209, 6.075.181, 6.091.001, 6.114.598, 6.130.364, 6.162.963 y 6.150.584. Véanse también los documentos WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 96/33735, WO 98/16654, WO 98/24893, WO 98/50433, WO 99/45031, WO 99/53049, WO 00/09560 y WO 001037504.

40 En el presente documento también se describe un procedimiento para fabricar anticuerpos anti-CD40 de animales no humanos, no murinos por inmunización de animales transgénicos no humanos que comprenden locus de inmunoglobulina humana con un antígeno CD40. Dichos animales pueden producirse utilizando los procedimientos descritos en los documentos citados anteriormente. Los procedimientos descritos en estos documentos pueden modificarse como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.994.619. Los animales no humanos pueden ser ratas, ovejas, cerdos, cabras, ganado vacuno o caballos.

45 Los ratones Xenomouse™ producen un repertorio humano de tipo adulto de anticuerpos completamente humanos y generan anticuerpos humanos específicos de antígeno. En algunos casos, los ratones Xenomouse™ contienen aproximadamente un 80% del repertorio del gen V del anticuerpo humano a través de la introducción de fragmentos de cromosomas artificiales de levaduras (YAC) de configuración línea germinal, de tamaño megabase, de los locus de cadena pesada humana y locus de cadena ligera kappa. Véase Mendez y col., Nature Genetics 15:146-156 (1997), Green y Jakobovits, J. Exp. Med. 188:483-495 (1998), y el documento WO 98/24893.

50 En algunos casos, el animal no humano que comprende genes de inmunoglobulina humana son animales que tienen un "minilocus" de inmunoglobulina humana. En la estrategia minilocus, a través de la inclusión de genes individuales procedentes del locus de Ig se simula un locus de Ig exógeno. Por tanto, en una construcción se forman uno o más genes V_H, uno o más genes D_H, uno o más genes J_H, un dominio constante *mu* y un segundo dominio constante (preferentemente un dominio constante gamma) para la inserción en un animal. Esta estrategia se describe, entre otros documentos, en las Patentes de Estados Unidos Nos 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650, 5.814.318, 5.591.669, 5.612.205, 5.721.367, 5.789.215 y 5.643.763.

55

Una ventaja de esta estrategia minilocus es la rapidez con la que pueden generarse construcciones que incluyen partes del locus de Ig e introducirse en los animales. Sin embargo, una posible desventaja de la estrategia minilocus es que puede no haber suficiente diversidad de inmunoglobulina para mantener el desarrollo completo de linfocitos B, de manera que puede haber una menor producción de anticuerpos.

5 En el presente documento también se describe un procedimiento para preparar anticuerpos anti-CD40 humanizados. En algunos casos, en el presente documento, se inmunizan animales no humanos inmunizados con un antígeno CD40, como se describe más adelante, en condiciones que permiten la producción de anticuerpos. Las células productoras de anticuerpos se aíslan de los animales, se fusionan con mielomas para producir hibridomas y se aíslan los ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo anti-CD40 de interés. Estos ácidos nucleicos se modifican después genéticamente utilizando técnicas conocidas por los expertos en la materia y como se describe adicionalmente más adelante para reducir la cantidad de secuencias no humanas, es decir, humanizar el anticuerpo para reducir las respuestas inmunitarias en seres humanos

15 En algunos casos descritos en el presente documento, el antígeno CD40 es CD40 aislado y/o purificado. En una realización preferida, el antígeno CD40 es CD40 humano. El antígeno CD40 puede ser un fragmento de CD40. El fragmento CD40 puede ser el dominio extracelular de CD40. El fragmento CD40 puede comprender al menos un epítipo de CD40. El antígeno CD40 también puede ser una célula que exprese o sobreexpresé CD40, o un fragmento inmunogénico del mismo, en su superficie. Los antígenos CD40 también pueden ser una proteína de fusión CD40.

20 La inmunización de animales puede realizarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1990. En la técnica se conocen bien procedimientos para inmunizar animales no humanos, tales como, ratones, ratas, ovejas, cabras, cerdos, ganado vacuno y caballos. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, citados anteriormente y en la Patente de Estados Unidos 5.994.619. El antígeno CD40 puede administrarse con un adyuvante para estimular la respuesta inmunitaria. Como adyuvantes ejemplares se incluyen el adyuvante completo o incompleto de Freund, RIBI (muramilo dipéptidos) o ISCOM (complejos inmunoestimuladores). Dichos adyuvantes pueden proteger al polipéptido de una rápida dispersión aislándolo en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulen al huésped para secretar factores que son quimiotácticos para macrófagos y otros componentes del sistema inmunitario. Preferentemente, si se administra un polipéptido, el esquema de inmunización implicará dos o más administraciones del polipéptido, distribuido a través de varias semanas.

30 El Ejemplo I describe la producción de anticuerpos anti-CD40 monoclonales.

Producción de anticuerpos y líneas celulares productoras de anticuerpos

35 Después de inmunizar a un animal con un antígeno CD40, pueden obtenerse anticuerpos y/o células productoras de anticuerpos del animal. En algunos casos descritos en el presente documento, se obtiene suero que contiene anticuerpos anti-CD40 haciendo sangrar o sacrificando al animal. El suero puede utilizarse tal y como se obtiene del animal, puede obtenerse una fracción de inmunoglobulina del suero, o los anticuerpos anti-CD40 pueden purificarse del suero. Un experto habitual en la técnica sabe que el suero o las inmunoglobulinas que se obtienen de esta manera serán policlonales. La desventaja de fusionar anticuerpos policlonales preparados a partir de suero es que la cantidad de anticuerpos que puede obtenerse está limitada y el anticuerpo policlonal tiene una serie de propiedades heterogénea.

40 En algunos casos descritos en el presente documento, se preparan líneas celulares inmortalizadas productoras de anticuerpos a partir de células aisladas del animal inmunizado. Después de la inmunización, el animal se sacrifica y se inmortalizan células de ganglios linfáticos y/o linfocitos B esplénicos. Los procedimientos de inmortalización de células incluyen, pero sin limitación, transferirlas con oncogenes, infectarlas con el virus oncogénico, cultivarlas en condiciones que se seleccionen para células inmortalizadas, someterlas a compuestos carcinogénicos o mutantes, fusionarlas con una célula inmortalizada, por ejemplo, una célula de mieloma, e inactivar un gen supresor tumoral. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, citados anteriormente. Si se utiliza fusión con células de mieloma, las células de mieloma no secretan preferentemente polipéptidos de inmunoglobulina (una línea celular no secretora). Las células inmortalizadas se exploran utilizando CD40, una parte del mismo, o una célula que exprese CD40. Como se describe en el presente documento, la exploración inicial puede realizarse utilizando un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo. En el documento WO 00/37504 se proporciona un ejemplo de exploración utilizando ELISA.

55 Las células productoras de anticuerpos anti-CD40, por ejemplo, hibridomas, se seleccionan, se clonan y después se analizan las características deseables, que incluyen crecimiento sólido, alta producción de anticuerpos y características deseables de anticuerpos, como se comenta más adelante. Los hibridomas pueden ampliarse *in vivo* en animales singénicos, en animales que carecen de un sistema inmunitario, por ejemplo, ratones desnudos o en cultivo celular *in vitro*. Los expertos en la técnica conocen bien procedimientos de selección, clonación y ampliación de hibridomas.

Como se describe en el presente documento, el animal inmunizado es un animal no humano que expresa genes de inmunoglobulina humana y los linfocitos B esplénicos se fusionan con una línea celular de mieloma de la misma especie que la del animal no humano. Preferentemente, el animal inmunizado es un animal XENOMOUSE™ y la línea celular de mieloma es un mieloma no secretor de ratón. Como se describe en el presente documento, la línea celular de mieloma es preferentemente P3-X63-AG8.653. Véase, por ejemplo, el Ejemplo L

En otro aspecto, la invención proporciona hibridomas que producen un anticuerpo anti-CD40 humano. En una realización preferida, los hibridomas son hibridomas de ratón, como se ha descrito anteriormente. En otras realizaciones, los hibridomas se producen en una especie no humana, en especies no murinas, tales como ratas, ovejas, cerdos, cabras, ganado vacuno o caballos. En otra realización, los hibridomas son hibridomas humanos.

10 Ácidos nucleicos, vectores, células huésped y procedimientos recombinantes para preparar anticuerpos

Ácidos nucleicos

La presente invención también incluye moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos anti-CD40 de la invención. En algunas realizaciones, diferentes moléculas de ácido nucleico pueden codificar una cadena pesada y una cadena ligera de una inmunoglobulina anti-CD40 como se reivindica. En otras realizaciones, la misma molécula de ácido nucleico codifica una cadena pesada y una cadena ligera de dicha inmunoglobulina anti-CD40.

En algunos casos descritos en el presente documento, la molécula de ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia del gen V_κ A3/A19 (DPK-15), L5 (DP5) o A27 (DPK-22) humano o una secuencia derivada de la misma. En algunos casos descritos en el presente documento, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos de un gen V_κ A3/A19 y un gen J_κ1, J_κ2 o J_κ3 o secuencias derivadas de los mismos. En algunos casos descritos en el presente documento, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos de un gen L5 V_κ y un gen J_κ4. En algunos casos la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos de un gen A27 V_λ y puede ser un gen J_κ3.

En algunos casos descritos en el presente documento, la molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera, codifica una secuencia de aminoácidos que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones de la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. En algunos casos descritos en el presente documento, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos V_L que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácidos no conservativas y/o 1, 2 o 3 sustituciones no conservativas en comparación con la secuencia de la línea germinal. Las sustituciones pueden estar en las regiones CDR, en las regiones marco conservadas o en el dominio constante.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena ligera (V_L) codifica una secuencia de aminoácidos de V_L que comprende una o más mutaciones en comparación con la secuencia de la línea germinal que son idénticas a las mutaciones encontradas en el V_L del anticuerpo 21.4.1. En este aspecto, también se describen los anticuerpos 3.1.1, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.12,10-8.3,15.1.1, 21.21, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1,2328.1 L -C92A, 23.29.1 y 24.2.1. En el presente documento también se describen moléculas de ácido nucleico que codifican al menos tres mutaciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la línea germinal encontrada en el V_L de uno de los anticuerpos 3.1.1, 3.1.1 L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1,21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23-5,1. 23.25.1, 2328.1, 2328.IL-C92A. 23.29.1 y 24.2.1.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de V_L del anticuerpo monoclonal 21.4.1 (SEC ID N°: 44). En este aspecto, también se describen los anticuerpos monoclonales 3.1.1 (SEC ID N°: 4), 3.1.1L-L4M-L83V (SEC ID N°: 94), 7.1.2 (SEC ID N°: 12), 10.8.3 (SEC ID N°: 20), 15.1.1 (SEC ID N°: 28), 21.2.1 (SEC ID N°: 36), 22.1.1 (SEC ID N°: 52), 23.5.1 (SEC ID N°: 60), 23.28.1 (SEC ID N°: 68), 23-28 0,1 L-C92A (SEC ID N°: 100), 23.29.1 (SEC ID N°: 76) o 24.2.1 (SEC ID N°: 84), o una parte de los mismos. En algunos casos dicha parte comprende al menos la región CDR3. En algunas realizaciones, el ácido nucleico codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de las CDR de dicho anticuerpo. En algunas realizaciones, dicha parte es una parte contigua que comprende CDR1-CDR3.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 44 o dicha secuencia sin la secuencia señal. En este aspecto, también se describen las secuencias de aminoácidos de las SEC ID Nos: 4,12, 20 28, 36. 52, 60, 68, 76, 84, 94 o 100, o dicha secuencia sin la secuencia señal. En algunas realizaciones preferidas la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 43 o dicha secuencia sin la secuencia señal. En este aspecto, también se describen las secuencias de nucleótidos de las SEC ID Nos: 3, 11, 19, 27, 35, 51, 59, 67, 75, 83, 93 o 99, o pueden ser una parte de las mismas, careciendo opcionalmente dichas secuencias de la secuencia señal.

En algunas realizaciones, dicha parte codifica una región V_L. En algunos casos descritas en el presente documento, dicha parte codifica al menos la región CDR2. En algunas realizaciones, el ácido nucleico codifica la secuencia de aminoácidos de las CDR de cadena ligera de dicho anticuerpo. En algunas realizaciones, dicha parte codifica una región contigua de la CDR1-CDR3.

En algunos casos, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos de V_L que tiene una identidad de al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % con una secuencia de aminoácidos de V_L de cualquiera de los anticuerpos 3.1.1, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1L-C92A, 23.29.1 o 24.2.1, o una secuencia de aminoácidos de V_L de una cualquiera de las SEC ID Nos: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 94 o 100. En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos de V_L idéntica a la secuencia de aminoácidos de V_L del anticuerpo 21.4.1 o a la SEC ID N°: 44. En el presente documento también se describen moléculas de ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones muy rigurosas, tales como las descritas anteriormente, con una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nos: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 94 o 100, o que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de las SEC ID Nos: 3, 11, 19, 27, 35, 43, 51, 59, 67, 75, 83, 93 o 99.

En otra realización, el ácido nucleico codifica una cadena ligera de longitud completa del anticuerpo 21.4.1. En este aspecto, también se describen los anticuerpos 3.1.1, 3.1.1L-LAM-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.0.1, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K o 24.2.1. En otra realización, el ácido nucleico codifica una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 48. En este aspecto, también se describen las SEC ID Nos: 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 94, 100 o 102, o una cadena ligera que comprende una mutación, tal como una descrita en el presente documento. Además, el ácido nucleico puede comprender la secuencia de nucleótidos de las SEC ID Nos: 7, 15, 23, 31, 39, 47, 55, 63, 71, 79 u 87, o una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena ligera que comprende una mutación, tal como una descrita en el presente documento.

Como se describe en el presente documento la molécula de ácido nucleico puede codificar el dominio variable de cadena pesada (V_H) que comprende una secuencia del gen 3-30+, 4-59, 1-02, 4.35 o 3-30.3 humano o una secuencia derivada de los mismos. En diversas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende un gen V_H 3-30+ humano, un gen D4 (DIR3) y un gen J_H 6 humano; un gen V_H 3-30+ humano, un gen D1-26 (DIR5) humano y un gen J_H 6 humano; un gen 4,35 V_H humano, un gen DIR3 humano y un gen J_H 6 humano; un gen 4-59 V_H humano, un gen D4-23 humano y un gen J_H 4 humano; un gen 1-02 V_H humano, un gen DLR1 humano y un gen J_H 4 humano; un gen 3-30+ V_H humano, un gen D6-19 (DIR3) humano y un gen J_H 4 humano; un gen 3-30+ V_H humano, un gen D1-1 humano y un gen J_H 6 humano; un gen 3-30+ V_H humano, un gen D4-17 humano y un gen J_H 6 humano; un gen 4-59 V_H humano, un gen D4-17 (DIR1) humano y un gen J_H 5 humano o secuencia derivada de los genes humanos.

En algunos casos descritos en el presente documento, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 mutaciones en comparación con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal de los genes V, D o J humanos. En algunos casos descritos en el presente documento, dichas mutaciones están en la región V_H . En algunas realizaciones, dichas mutaciones están en las regiones CDR.

Como se describe en el presente documento, la molécula de ácido nucleico puede codificar una o más mutaciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la línea germinal que es idéntica a las mutaciones de aminoácidos encontradas en el V_H del anticuerpo monoclonal 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.29.1 y 24.2.1. En algunos casos, el ácido nucleico que codifica al menos tres mutaciones de aminoácidos en comparación con las secuencias de la línea germinal que son idénticas a al menos tres mutaciones de aminoácidos encontradas en uno de los anticuerpos monoclonales indicados anteriormente.

En algunos casos descritos en el presente documento la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una parte de la secuencia de aminoácidos de V_H del anticuerpo 3.1.1 (SEC ID N°: 2), 3.1.1H-A78T (SEC ID N°: 90), 3.1.1H-A78T-V88A-V97A (SEC ID N°: 92), 7.1.2 (SEC ID N°: 10), 10.8.3 (SEC ID N°: 18), 15.1.1 (SEC ID N°: 26), 21.2.1 (SEC ID N°: 34), 21.4.1 (SEC ID N°: 42), 22.1.1 (SEC ID N°: 50), 22.1.1H-C109A (SEC ID N°: 96), 23.5.1 (SEC ID N°: 58), 23.28.1 (SEC ID N°: 66), 23.28.1H-D16E (SEC ID N°: 98), 23.29.1 (SEC ID N°: 74) o 24.2.1 (SEC ID N°: 82), o dicha secuencia que tiene mutaciones de aminoácidos conservativas y/o un total de tres o menos sustituciones de aminoácidos no conservativas. En algunos casos descritos en el presente documento, la secuencia codifica una o más regiones CDR, preferentemente una región CDR3, las tres regiones CDR, una parte contigua que incluye CDR1-CDR3, o toda la región V_H , con o sin una secuencia señal.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 42 o dicha secuencia sin la secuencia señal. En este aspecto también se describen las secuencias de aminoácidos de las SEC ID Nos: 2, 10, 18, 26, 34, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96 y 98, o dicha secuencia sin la secuencia señal. En algunos casos descritos en el presente documento, la molécula de ácido nucleico comprende al menos una parte de la secuencia de nucleótidos de las SEC ID Nos: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 91, 95 o 97 o dicha secuencia sin la secuencia señal. En algunos casos descritos en el presente documento, dicha parte codifica la región V_H (con o sin una secuencia señal), una región CDR3, las tres regiones CDR o una región contigua que incluye CDR1-CDR3.

En algunos casos descritos en el presente documento, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos de V_H que tiene una identidad de al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% con las

secuencias de aminoácidos de V_H mostradas en las Figs. 1A-1C o 2A-2C o con una secuencia de aminoácidos de V_H de una cualquiera de las SEC ID Nos: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96 o 98. En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos de V_H idéntica a la secuencia de aminoácidos de V_H de la SEC ID N° 42. Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento incluyen ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones muy rigurosas, tales como las descritas anteriormente, con una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nos: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96 o 98 o que tiene la secuencia de ácido nucleico de las SEC ID Nos: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 91, 95 o 97. En una realización de la invención el ácido nucleico tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 41. También se describen moléculas de ácido nucleico que se hibridan en condiciones muy rigurosas, tales como las descritas anteriormente, con una secuencia de ácido nucleico que codifica un V_H descrito justo anteriormente.

En otra realización, el ácido nucleico codifica una cadena pesada de longitud completa del anticuerpo 21.4.1 o una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 46. En este aspecto también se describen ácidos nucleicos que codifican una cadena pesada de longitud completa de un anticuerpo seleccionado de 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A, V97A, 7.1.2, 10.8.3,15.1.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.29.1 y 24.2.1 o una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nos: 6,14, 22, 30, 38, 54, 62, 70, 78 u 86, o una cadena pesada que comprende una mutación, tal como una de las mutaciones indicadas en el presente documento. En otra realización, el ácido nucleico puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 45. Adicionalmente en el presente documento se describe que el ácido nucleico puede comprender la secuencia de nucleótidos de las SEC ID N°: 5, 13, 21, 29, 37, 53, 61, 69, 77, 85 u 89, o una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena pesada que comprende una mutación, tal como una de las mutaciones descritas en el presente documento.

Una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera completa o pesada de un anticuerpo anti-CD40 o partes de las mismas puede aislarse de cualquier fuente que produzca dicho anticuerpo. Como se describe en el presente documento, las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden aislarse de un linfocito B aislado de un animal inmunizado con CD40 o de una célula inmortalizada derivada de dicho linfocito B que expresa un anticuerpo anti-CD40. En la técnica se conocen bien procedimientos para aislar ARNm que codifica un anticuerpo. Véase, por ejemplo, Sambrook y col. El ARNm puede utilizarse para producir ADNc para su uso en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o clonación de ADNc de genes de anticuerpos. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico se aísla de un hibridoma que tiene como uno de sus compañeros de fusión una célula productora de inmunoglobulina humana de un animal transgénico no humano. Preferentemente, la célula productora de inmunoglobulina humana se aísla de un animal XenoMouse™. Como también se describe en el presente documento la célula productora de inmunoglobulina humana es de un animal transgénico, no humano, no murino, como se ha descrito anteriormente. En el presente documento también se describe que el ácido nucleico puede aislarse de un animal no transgénico, no humano. Las moléculas de ácido nucleico aisladas de un animal no humano, no transgénico pueden utilizarse, por ejemplo, para anticuerpos humanizados.

En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD40 de la invención puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio V_H de la invención unido en marco a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio constante de cadena pesada de cualquier fuente. De manera similar, una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD40 de la invención puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio V_L de la invención unido en marco a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio constante de cadena ligera de cualquier fuente.

En un aspecto adicional de la invención, las moléculas de ácido nucleico que codifican el dominio variable de las cadenas pesada (V_H) y ligera (V_L) se "convierten" en genes de anticuerpos de longitud completa. En una realización, las moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios V_H o V_L se convierten en genes de anticuerpos de longitud completa por inserción en un vector de expresión que ya codifica los dominios constantes de cadena ligera o constantes de cadena pesada respectivamente, de tal manera que el segmento V_H está unido operativamente con el segmento (o segmentos) C_H dentro del vector, y el segmento V_L está unido operativamente con el segmento C_L dentro del vector. En otra realización, las moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios V_H y/o V_L se convierten en genes de anticuerpos de longitud completa mediante uniones, por ejemplo, ligando una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio V_H y/o V_L con una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio C_H y/o C_L utilizando técnicas convencionales de biología molecular. En la técnica se conocen secuencias de ácido nucleico de genes de dominio constante de inmunoglobulina humana de cadena pesada y ligera. Véase, por ejemplo Kabat y col, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., NIH Publ. N° 91-3242, 1991. Después, las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas ligera y/o pesada de longitud completa pueden expresarse en una célula en la que se han introducido y el anticuerpo anti-CD40 puede aislarse.

Las moléculas de ácido nucleico pueden utilizarse para expresar de manera recombinante grandes cantidades de anticuerpos anti-CD40. Las moléculas de ácido nucleico también pueden utilizarse para producir anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos monocatenarios, inmunoadhesinas, diacuerpos, anticuerpos mutados y derivados de anticuerpos, como también se describe más adelante. Si las moléculas de ácido nucleico proceden de un animal no humano, no transgénico, las moléculas de ácido nucleico pueden utilizarse para la humanización de anticuerpos, como se describe más adelante.

En el presente documento también se describe el uso de moléculas de ácido nucleico de la invención como una sonda o cebador PCR para una secuencia de anticuerpos específica. Por ejemplo, el ácido nucleico puede utilizarse como una sonda en procedimientos de diagnóstico o como un cebador PCR para amplificar regiones de ADN que podrían utilizarse, entre otras cosas, para aislar moléculas de ácido nucleico adicionales que codifican dominios variables de anticuerpos anti-CD40. En algunos casos descritos en el presente documento, las moléculas de ácido nucleico son oligonucleótidos. En algunos casos descritos en el presente documento, los oligonucleótidos son de regiones muy variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo de interés. En algunos casos, los oligonucleótidos codifican toda o parte de una o más de las CDR de los anticuerpos 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2,10.8.3, 15.1.1,21.4.1,21.2.1,22.1. 1,22.1.1 H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.28.1L-C92A, 23.29.1 y 24.2.1.

Vectores

La invención proporciona vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena pesada de un anticuerpo anti-CD40 de la invención o una parte de unión a antígeno del mismo. La invención también proporciona vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena ligera de dichos anticuerpos o parte de unión a antígeno de los mismos. En el presente documento también se describen vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión, anticuerpos modificados, fragmentos de anticuerpo y sondas de los mismos.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD40, o partes de unión a antígeno de los mismos se expresan insertando los ADN que codifican cadenas ligera y pesada parcial o de longitud completa, obtenidas como se ha descrito anteriormente, en vectores de expresión de tal manera que los genes están unidos operativamente a secuencias de control de expresión necesarias tales como secuencias de control transcripcionales y traduccionales. Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados (AAV), virus de plantas, tales como el virus del mosaico de la coliflor, el virus del mosaico del tabaco, cósmidos, YAC, episomas derivados del EBV y similares. El gen del anticuerpo está ligado en un vector de tal manera que las secuencias de control transcripcionales y traduccionales dentro del vector ejercen su función prevista para regular la transcripción y la traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se seleccionan para ser compatibles con la célula huésped de expresión utilizada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores distintos. En una realización preferida, los dos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante procedimientos convencionales (por ejemplo, ligamiento de sitios de restricción complementarios sobre el fragmento génico del anticuerpo y ligamiento de vectores o de extremos romos si no hay sitios de restricción).

Un vector adecuado es uno que codifica una secuencia de inmunoglobulina C_H o C_L humana funcionalmente completa, con sitios de restricción apropiados modificados genéticamente, de tal manera que, cualquier secuencia V_H o V_L pueda insertarse y expresarse fácilmente, como se ha descrito anteriormente. En dichos vectores, normalmente el corte y empalme se produce entre el sitio donante de corte y empalme en la región J insertada y el sitio aceptor de corte y empalme anterior al dominio C humano, y también en las regiones de corte y empalme que se producen en los exones C_H humanos. La poliadenilación y la terminación de la transcripción se producen en sitios del cromosoma natural aguas abajo de las regiones codificantes. El vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena del anticuerpo de una célula huésped. El gen de la cadena del anticuerpo puede clonarse en el vector de tal manera que el péptido señal esté unido en marco con el extremo amino de la cadena de inmunoglobulina. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína que no es una inmunoglobulina).

Además de los genes de la cadena del anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención llevan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena del anticuerpo en una célula huésped. Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que va a transformarse, del nivel de expresión de proteína deseado, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión en células huésped de mamífero incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamífero, tal como promotores y/o potenciadores derivados de LTR retrovirales, citomegalovirus (CMV) (tal como el promotor/potenciador del CMV), el virus del Simio 40 (SV40) (tal como el promotor/potenciador del SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor principal tardío de adenovirus (AdMLP)), polioma y promotores fuertes de mamífero tales como promotores de actina e inmunoglobulina natural. Para una descripción adicional de elementos reguladores virales y secuencias de los mismos, véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos 5.168.062, 4.510.245 y 4.968.615. En la técnica se conocen procedimientos para expresar anticuerpos en plantas, que incluyen una descripción de promotores y vectores, así como transformación de plantas. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 6.517.529. En la técnica también se conocen bien procedimientos para expresar polipéptidos en células bacterianas o en células fúngicas, por ejemplo, en células de levadura.

Además de los genes de la cadena del anticuerpo y secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores de selección.

El gen marcador de selección facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Por ejemplo, típicamente el gen marcador de selección confiere resistencia a fármacos, tal como G418, higromicina o metotrexato en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores de selección preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células huésped dhfr con selección/amplificación de metotrexato), el gen neo (para selección de G418), y el gen glutamato sintetasa.

Células huésped que no son de híbridoma y procedimientos de producción de proteínas utilizando técnicas recombinantes

Las moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-CD40 y los vectores que comprenden estas moléculas de ácido nucleico pueden utilizarse para la transfección de una célula huésped de mamífero, planta, bacteria o levadura adecuada. La transformación puede realizarse mediante cualquier procedimiento conocido de introducción de polinucleótidos en una célula huésped. En la técnica se conocen bien procedimientos para introducir polinucleótidos heterólogos en células de mamífero e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato cálcico, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del polinucleótido (o polinucleótidos) en liposomas y microinyección directa del ADN en el núcleo. Además, pueden introducirse moléculas de ácido nucleico en células de mamífero mediante vectores virales. En la técnica se conocen bien procedimientos de transformación de células. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455. En la técnica se conocen procedimientos de transformación de células de plantas incluyendo, por ejemplo, transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación biolística, inyección directa, electroporación y transformación viral. En la técnica se conocen bien procedimientos de transformación de células bacterianas y de levaduras.

En la técnica se conocen bien líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Estas incluyen, entre otras, células de ovario de hámster chino (CHO), células NSO, SP2, células HeLa, células renales de cría de hámster (BHK, *Baby*), células renales de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células A549 y diversas otras líneas celulares. Las líneas celulares de particular preferencia se seleccionan determinando las líneas celulares que tienen los niveles de expresión más altos. Otras líneas celulares que pueden utilizarse son las líneas celulares de insecto, tales como las células Sf9. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes, que codifican genes de anticuerpos, en células huésped de mamíferos, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped, o más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo utilizando procedimientos de purificación de proteínas convencionales. Las células huésped de plantas incluyen, por ejemplo, *Nicotiana*, *Arabidopsis*, lenteja acuática, maíz, trigo, patata, etc. Las células huésped de bacterias incluyen *E. coli* y especies de *Streptomyces*. Las células huésped de levaduras incluyen *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

Adicionalmente, la expresión de los anticuerpos de la invención (u otros restos de los mismos) para la producción de líneas celulares pueden potenciarse utilizando diversas técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión del gen glutamina sintetasa (el sistema GS) es una estrategia común para potenciar la expresión en determinadas condiciones. El sistema GS se analiza por completo con referencia a las Patentes Europeas Nos 0 216 846, 0 256 055 y 0 323 997 y la Solicitud de Patente Europea N° 89303964.4.

Es probable que los anticuerpos expresados por diferentes líneas celulares o en animales transgénicos tengan un patrón de glucosilación diferente entre sí. Sin embargo, todos los anticuerpos codificados por las moléculas de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento, o que comprenden las secuencias de aminoácidos proporcionadas en el presente documento, forman parte de la presente invención, independientemente de la glucosilación de los anticuerpos.

Animales transgénicos y plantas transgénicas

Los anticuerpos anti-CD40 de la invención también pueden producirse transgénicamente a través de la generación de un mamífero transgénico o una planta transgénica para las secuencias de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de interés y para la producción de anticuerpos en una forma recuperable de los mismos. En relación con la producción transgénica en mamíferos, pueden producirse anticuerpos anti-CD40 en, y recuperarse de, leche de cabra, vaca u otros mamíferos. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos 5.827.690, 5.756.687, 5.750.172 y 5.741.957. En algunas realizaciones, los animales transgénicos no humanos que comprenden los locus de inmunoglobulina humana están inmunizados con CD40 o con una parte inmunogénica del mismo, como se ha descrito anteriormente. Se describen procedimientos para preparar anticuerpos en plantas, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos 6.046.037 y 5.959.177.

En algunas realizaciones, los animales transgénicos no humanos o las plantas transgénicas se producen introduciendo una o más moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo anti-CD40 de la invención en el animal o planta mediante técnicas transgénicas convencionales. Véase Hogan y la Patente de Estados Unidos

6.417.429, citada anteriormente. Las células transgénicas utilizadas para producir los animales transgénicos pueden ser células madre embrionarias o células somáticas. Los organismos no humanos transgénicos pueden ser quiméricos, no quiméricos, heterocigotos y homocigotos no quiméricos. Véase, por ejemplo, Hogan y col., *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual 2ed.*, Cold Spring Harbor Press (1999); Jackson y col., *Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach*, Oxford University Press (2000); y Pinkert, *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook*, Academic Press (1999). En algunas realizaciones, los animales no humanos transgénicos tienen una alteración y sustitución diana por una construcción diana que codifica una cadena pesada y/o una cadena ligera de interés. En una realización preferida, los animales transgénicos comprenden y expresan moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesadas y ligeras que se unen específicamente a CD40, preferentemente a CD40 humano. En algunas realizaciones, los animales transgénicos comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo modificado tal como un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos anti-CD40 pueden prepararse en cualquier animal transgénico. En una realización preferida, los animales no humanos son ratones, ratas, ovejas, cerdos, cabras, vacas o caballos. El animal transgénico no humano expresa dichos polipéptidos codificados en sangre, leche, orina, saliva, lágrimas, moco u otros fluidos corporales.

Bibliotecas de presentación de fagos

En el presente documento también se describe un procedimiento para producir un anticuerpo anti-CD40, o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende las etapas de sintetizar una biblioteca de anticuerpos humanos en fagos, explorar la biblioteca con CD40 o una parte del mismo, aislar el fago que se une a CD40 y obtener el anticuerpo del fago. Como ejemplo, un procedimiento para preparar la biblioteca de anticuerpos para su uso en técnicas de presentación en fagos comprende las etapas de inmunizar a un animal no humano, que comprende locus de inmunoglobulina humana, con CD40 o una parte antigénica del mismo para crear una respuesta inmunitaria, extraer las células productoras de anticuerpos del animal inmunizado; aislar el ARN de las células extraídas, invertir la transcripción del ARN para producir ADNc, amplificar el ADNc utilizando un cebador, e insertar el ADNc en un vector de presentación de fagos de tal manera que los anticuerpos se expresen en el fago. Los anticuerpos anti-CD40 recombinantes de la invención pueden obtenerse de esta manera.

Los anticuerpos anti-CD40 humanos recombinantes de la invención pueden aislarse explorando una biblioteca de anticuerpos combinatoria recombinante. Preferentemente la biblioteca es una biblioteca de presentación de fagos scFv, generada utilizando los ADNc de V_L y V_H humanos preparados a partir de ARNm aislado de linfocitos B. En la técnica se conocen metodologías para preparar y explorar dichas bibliotecas. Existen kits disponibles en el mercado para generar bibliotecas de presentación de fagos (por ejemplo, el Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, catálogo N° 27-9400-01; y el kit de presentación de fagos SurfZAP™ de Stratagene, N° de catálogo 240612). También existen otros procedimientos y reactivos que pueden utilizarse en la generación y exploración de bibliotecas de presentación de fagos (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.223.409; las publicaciones PCT Nos WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; Fuchs y col., *Bio/Technology* 9:1370-1372 (1991); Hay y col., *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85 (1992); Huse y col., *Science* 246:1275-1281 (1989); McCafferty y col., *Nature* 348:552-554 (1990); Griffiths y col., *EMBO J.* 12:725-734 (1993); Hawkins y col., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992); Clackson y col., *Nature* 352:624-628 (1991); Gram y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580 (1992); Garrad y col., *Bio/Technology* 9: 1373-1377 (1991); Hoogenboom y col., *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137 (1991); y Barbas y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982 (1991).

En un ejemplo descrito en el presente documento, para aislar un anticuerpo anti-CD40 humano con las características deseadas, un anticuerpo anti-CD40 humano, como se describe en el presente documento, se utiliza primero para seleccionar secuencias humanas de cadena pesada y ligera que tienen actividad de unión similar hacia CD40 utilizando los procedimientos de impresión de epítopes descritos en la publicación PCT N° WO 93/06213. Las bibliotecas de anticuerpos utilizadas en este procedimiento son preferentemente bibliotecas de scFv preparadas y exploradas como se describe en la publicación PCT N° WO 92/01047, McCafferty y col., *Nature* 348:552-554 (1990); y Griffiths y col., *EMBO J.* 12:725-734 (1993). Las bibliotecas de anticuerpos scFv se exploran preferentemente utilizando CD40 como el antígeno.

Una vez seleccionados los dominios V_L y V_H humanos iniciales, se realizan experimentos de "mezcla y emparejamiento", en los que diferentes pares de los segmentos V_L y V_H inicialmente seleccionados se exploran con respecto a la unión a CD40 para seleccionar combinaciones de pares V_L/V_H preferidas. Adicionalmente, para mejorar más la calidad del anticuerpo, los segmentos V_L y V_H del par (o pares) V_L/V_H preferidos pueden mutarse al azar, preferentemente en la región CDR3 de V_H y/o V_L , en un proceso análogo al proceso de mutación somática *in vivo* responsable de la maduración por afinidad de anticuerpos durante una respuesta inmunitaria natural. Esta maduración por afinidad *in vitro* puede conseguirse amplificando los dominios V_H y V_L utilizando cebadores PCR complementarios con la CDR3 V_H o CDR3 V_L , respectivamente, cuyos cebadores se han "enriquecido" con una mezcla al azar de las cuatro bases de nucleótidos en determinadas posiciones, de tal manera que los productos resultantes de la PCR codifican los segmentos V_H y V_L en los que se han introducido mutaciones aleatorias en las regiones CDR3 V_H y/o V_L . Estos segmentos V_H y V_L mutados al azar pueden volver a explorarse con respecto a la unión a CD40.

Después de la exploración y aislamiento de un anticuerpo anti-CD40 de la invención a partir de una biblioteca de presentación de inmunoglobulina recombinante, los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo seleccionado pueden recuperarse del conjunto de presentación (por ejemplo, del genoma del fago) y subclonarse en otros vectores de expresión mediante técnicas convencionales de ADN recombinante. Si se desea, el ácido nucleico puede manipularse adicionalmente para crear otras formas de anticuerpos de la invención, como se describe más adelante. Para expresar un anticuerpo humano recombinante aislado mediante la exploración de una biblioteca combinatoria, el ADN que codifica el anticuerpo se clona en un vector de expresión recombinante y se introduce en una célula huésped de mamífero, como se ha descrito anteriormente.

Cambio de clase

Otro aspecto de la invención proporciona un procedimiento para convertir la clase o subclase de un anticuerpo anti-CD40 en otra clase o subclase. En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico que codifica una V_L o V_H que no incluye ninguna secuencia de ácido nucleico que codifique C_L o C_H se aísla utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica. Después, la molécula de ácido nucleico se une operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifique una C_L o C_H de una clase o subclase de inmunoglobulina deseada. Esto puede conseguirse utilizando un vector o una molécula de ácido nucleico que comprenda una cadena C_L o C_H , como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40 que era originalmente IgM puede cambiarse de clase a una IgG. Además, el cambio de clase puede utilizarse para convertir una subclase de IgG en otra, por ejemplo, de IgG1 a IgG2. Otro procedimiento para producir un anticuerpo de la invención que comprenda un isotipo deseado comprende las etapas de aislar un ácido nucleico que codifique una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD40 y un ácido nucleico que codifique una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD40, aislar la secuencia que codifique la región V_H , ligar la secuencia V_H con una secuencia que codifique un dominio constante de cadena pesada del isotipo deseado, expresar el gen de cadena ligera y la construcción de cadena pesada en una célula y recoger el anticuerpo anti-CD40 con el isotipo deseado.

Anticuerpos desinmunizados

Otra forma de producir anticuerpos con inmunogenicidad reducida es la desinmunización de anticuerpos. Como se describe en el presente documento, el anticuerpo puede desinmunizarse utilizando las técnicas descritas, por ejemplo, en las Publicaciones PCT Nos WO98/52976 y WO00/34317.

Anticuerpos mutados

Como se describe en el presente documento, para preparar anticuerpos anti-CD40 mutados pueden utilizarse moléculas de ácido nucleico, vectores y células huésped. Los anticuerpos pueden mutarse en los dominios variables de las cadenas pesadas y/o ligeras, por ejemplo, para modificar una propiedad de unión del anticuerpo. Por ejemplo, puede realizarse una mutación en una o más de las regiones CDR para aumentar o disminuir la K_D del anticuerpo por CD40, para aumentar o disminuir la K_{off} o para modificar la especificidad de unión del anticuerpo. En la materia se conocen bien técnicas de mutagénesis dirigida. Véase, por ejemplo, Sambrook y col. y Ausubel y col., citado anteriormente. Como se describe en el presente documento, las mutaciones se realizan en un resto de aminoácido que se sabe que está cambiado en comparación con la línea germinal en un dominio variable de un anticuerpo anti-CD40. En el presente documento también se describe que pueden realizarse una o más mutaciones en un resto de aminoácido que se sabe que está cambiado en comparación con la línea germinal en una región CDR o en una región marco conservada de un dominio variable, o en un dominio constante de un anticuerpo monoclonal 3.1.1, 3.1.1HA78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-LAM-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 221.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K y 24.2.1. En el presente documento también se describen una o más mutaciones realizadas en un resto de aminoácido que se sabe que está cambiado en comparación con la línea germinal en una región CDR o en una región marco conservada de un dominio variable de una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEC ID Nos: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 94, 100, 102, 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96, 98, 100 o 102, o cuya secuencia de ácido nucleico se presenta en las SEC ID Nos: 3, 11, 19, 27, 35, 43, 51, 59, 67, 75, 83, 93, 99 101, 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 91, 95, 97, 99 o 101.

En un ejemplo descrito en el presente documento, la región marco conservada está mutada de tal manera que la región (o regiones) marco conservada resultante tienen la secuencia de aminoácidos del gen de la línea germinal correspondiente. Puede realizarse una mutación en una región marco conservada o en un dominio constante para aumentar la semivida del anticuerpo anti-CD40. Véase, por ejemplo, la publicación PCT N° WO 00/09560. También puede realizarse una mutación en una región marco conservada o en un dominio constante para modificar la inmunogenicidad del anticuerpo, para proporcionar un sitio para la unión covalente o no covalente con otra molécula o para modificar propiedades tales como la fijación del complemento, unión a FcR y CCDA. De acuerdo con la invención, un solo anticuerpo puede tener mutaciones en una cualquiera o más de las regiones marco conservadas, en el dominio constante y en las regiones variables.

En algunos ejemplos descritos en el presente documento, hay de 1 a 18 mutaciones de aminoácidos, incluyendo cualquier número entre ellos, en cualquiera de los dominios V_H o V_L del anticuerpo anti-CD40 mutado en comparación con el anticuerpo anti-CD40 antes de la mutación. En cualquiera de lo anterior, las mutaciones pueden

producirse en una o más regiones CDR. Además, cualquiera de las mutaciones pueden ser sustituciones de aminoácidos conservativas. En algunas realizaciones, no hay más de 5, 4, 3, 2 o 1 cambio de aminoácidos en las regiones constantes.

Anticuerpos modificados

5 En otro ejemplo descrito en el presente documento puede prepararse un anticuerpo de fusión o inmunoadhesina que comprenda todo, o una parte, del anticuerpo anti-CD40 de la invención unido a otro polipéptido. En un caso solamente los dominios variables del anticuerpo anti-CD40 están unidos al polipéptido. En otro caso preferido el dominio V_H de un anticuerpo anti-CD40 está unido a un primer polipéptido, mientras que el dominio V_L de un anticuerpo anti-CD40 está unido a un segundo polipéptido que se asocia con el primer polipéptido de tal manera que los dominios V_H y V_L pueden interactuar entre sí para formar un sitio de unión a anticuerpo. En otra realización preferida, el dominio V_H está separado del dominio V_L mediante un engarce de tal manera que los dominios V_H y V_L pueden interactuar entre sí (véase más adelante en *Anticuerpos monocatenarios*). El anticuerpo V_H -engarce- V_L se une después al polipéptido de interés. El anticuerpo de fusión es útil para dirigir un polipéptido hacia una célula o tejido que exprese CD40. El polipéptido puede ser un agente terapéutico, tal como una toxina, un factor de crecimiento u otra proteína reguladora, o puede ser un agente de diagnóstico, tal como una enzima que pueda observarse fácilmente, tal como peroxidasa de rábano picante. Además, pueden crearse anticuerpos de fusión en los que dos (o más) anticuerpos monocatenarios están unidos entre sí. Esto es útil si se desea crear un anticuerpo divalente o polivalente en una sola cadena polipeptídica, o si se desea crear un anticuerpo biespecífico.

20 Para crear un anticuerpo monocatenario, (scFv) los fragmentos de ADN que codifican V_H y V_L están unidos operativamente a otro fragmento que codifica un engarce flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos $(Gly_4-Ser)_3$, de tal manera que las secuencias V_H y V_L pueden expresarse como una cadena monocatenaria contigua, con los dominios V_L y V_H unidos por el engarce flexible. Véase, por ejemplo, Bird y col., Science 242:423-426 (1988); Huston y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:5879-5883 (1988); McCafferty y col., Nature 348:552-554 (1990). El anticuerpo monocatenario puede ser monovalente, si solo se utiliza un V_H y V_L sencillo, bivalente, si se utilizan dos V_H y V_L , o polivalente, si se utilizan más de dos V_H y V_L . Pueden generarse anticuerpos biespecíficos o polivalentes que se unan específicamente a CD40 o a otra molécula.

25 En otros ejemplos descritos en el presente documento, pueden prepararse otros anticuerpos modificados utilizando moléculas de ácido nucleico que codifiquen anticuerpos anti-CD40. Por ejemplo, pueden prepararse "cuerpos kappa" (Ill y col., Protein Eng. 10: 949-57 (1997)), "Minicuerpos" (Martin y col, EMBO J. 13: 5303-9 (1994)), "Diacuerpos" (Bolliger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)), o "Janusinas" (Traunecker y col., EMBO J. 10:3655-3659 (1991) y Traunecker y col., Int. J. Cancer (Supl.) 7:51-52 (1992)) utilizando técnicas de biología molecular convencionales siguiendo lo indicado en la memoria descriptiva.

30 Los anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión a antígeno pueden producirse mediante diversos procedimientos, incluyendo fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990), Kostelny y col., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992). Además, los anticuerpos biespecíficos pueden formarse como "diacuerpos" o "Janusinas". En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico se une a dos epítodos diferentes de CD40. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico tiene una primera cadena pesada y una primera cadena ligera del anticuerpo monoclonal 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1. 2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.28.1L- C92A. 23.29.1, 23.29.1L-R174K y 24.2.1, y una cadena ligera y cadena pesada de anticuerpo adicional. En algunas realizaciones, la cadena ligera y la cadena pesada adicional también proceden de uno de los anticuerpos monoclonales identificados anteriormente, pero difieren de las primeras cadenas pesada y ligera.

35 En algunos ejemplos, los anticuerpos modificados descritos anteriormente se preparan utilizando uno o más de los dominios variables o regiones CDR de un anticuerpo monoclonal anti-CD40 humano proporcionado en el presente documento, a partir de una secuencia de aminoácidos de dicho anticuerpo monoclonal, o a partir de una cadena pesada o cadena ligera codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo monoclonal.

Anticuerpos derivatizados y marcados

40 Un anticuerpo anti-CD40, o parte de unión a antígeno, de la invención puede derivatizarse o unirse con otra molécula (por ejemplo, otro péptido o proteína). En general, los anticuerpos, o parte de los mismos, se derivatizan de tal manera que la unión a CD40 no se ve afectada de manera adversa por la derivatización o marcaje. Por consiguiente, los anticuerpos y partes de los anticuerpos de la invención pretenden incluir formas tanto intactas como modificadas de los anticuerpos anti-CD40 humanos descritos en el presente documento. Por ejemplo, un anticuerpo o parte de anticuerpo de la invención puede unirse funcionalmente (mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) con una o más entidades moleculares distintas, tal como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente de detección, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o un péptido que pueda mediar la asociación del anticuerpo o parte de anticuerpo con otra molécula (tal como una región núcleo de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina).

Un tipo de anticuerpo derivatizado se produce entrecruzando dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de tipos diferentes, por ejemplo, para crear anticuerpos biespecíficos). Como entrecruzamientos adecuados se incluyen los que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos claramente reactivos separados por un espaciador apropiado (por ejemplo, m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida éster) u homobifuncionales (por ejemplo, suberato de disuccinimidilo). Dichos engarces se encuentran disponibles en Pierce Cematical Company, Rockford, Ill.

Otro tipo de anticuerpo derivatizado es un anticuerpo marcado. Los agentes de detección útiles con los que puede derivatizarse un anticuerpo o parte de unión a antígeno de la invención incluyen compuestos fluorescentes, incluyendo la fluoresceína, el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, el cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, la ficoeritrina, los fósforos lantánidos y similares. Un anticuerpo también puede marcarse con enzimas, tales como peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y similares, que son útiles para la detección. Cuando un anticuerpo se marca con una enzima detectable, este se detecta añadiendo reactivos adicionales que la enzima utiliza para producir un producto de reacción que puede diferenciarse. Por ejemplo, cuando el agente peroxidasa de rábano picante está presente, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción con color que puede detectarse. Un anticuerpo también puede marcarse con biotina y detectarse a través de la medición indirecta de unión a avidina o estreptavidina. Un anticuerpo también puede marcarse con un epítope polipeptídico predeterminado reconocido por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas epitópicas). En algunos casos descritos en el presente documento, los marcadores se unen mediante brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el posible impedimento estérico.

Un anticuerpo anti-CD40 también puede marcarse con un aminoácido radiomarcado. El marcador radioactivo puede utilizarse con fines de diagnóstico y terapéutico. Por ejemplo, el marcador radioactivo puede utilizarse para detectar por rayos X, u otras técnicas de diagnóstico, tumores que expresen CD40. Además, el marcador radioactivo puede utilizarse terapéuticamente como una toxina para células cancerosas o tumores. Como ejemplos de marcadores para polipéptidos se incluyen, pero sin limitación, los siguientes radioisótopos o radionúclidos - ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I .

Un anticuerpo anti-CD40 también puede derivatizarse con un grupo químico, tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo, o un grupo carbohidrato. Estos grupos son útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, por ejemplo, para aumentar la semi-vida en suero o para aumentar la unión tisular.

30 Composiciones farmacéuticas y Kits

La invención también se refiere a composiciones que comprenden un anticuerpo anti-CD40 agonista humano para su uso en el tratamiento de sujetos que necesiten inmunoestimulación. Dichas composiciones son útiles para tratar, prevenir, reducir la frecuencia, o la gravedad de, infección, incluyendo infección viral y bacteriana, para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo, incluyendo afecciones cancerosas y precancerosas, para tratar afecciones de inmunodeficiencia genética, tales como el síndrome de hiper-IgM y para tratar afecciones de inmunodeficiencia primaria o combinada, incluyendo afecciones caracterizadas por neutropenia, en un mamífero, incluyendo seres humanos. Como sujetos para el tratamiento con terapia de anticuerpos anti-CD40 agonistas se incluyen cualquier sujeto que necesite mejora inmunitaria, incluyendo pero sin limitación, individuos de edad avanzada y los que están inmunosuprimidos, por ejemplo, debido a quimioterapia.

Los trastornos hiperproliferativos que pueden tratarse con un anticuerpo anti-CD40 agonista de la invención pueden implicar cualquier tejido u órgano e incluyen, pero sin limitación, cáncer de cerebro, de pulmón, de células escamosas, de vejiga, gástrico, pancreático, de mama, de cabeza, cuello, hígado, renal, de ovario, próstata, colorrectal, esofágico, ginecológico, nasofaríngeo o tiroideo, melanomas, linfomas, leucemias o mielomas múltiples. En particular, los anticuerpos anti-CD40 agonistas humanos de la invención son útiles para tratar carcinomas de mama, próstata, colon y pulmón.

El tratamiento puede implicar la administración de uno o más anticuerpos monoclonales anti-CD40 agonistas de la invención, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, en solitario o con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares que sean fisiológicamente compatibles. Algunos ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptable son agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio. Son ejemplos adicionales de sustancias farmacéuticamente aceptables los agentes humectantes o cantidades ínfimas de sustancias complementarias, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la semivida o efectividad del anticuerpo.

Los anticuerpos anti-CD40 agonistas de la invención y las composiciones que los contienen, pueden administrarse en combinación con uno o más agentes terapéuticos, de diagnóstico o profilácticos distintos. Como agentes terapéuticos adicionales se incluyen otros agentes anti-neoplásicos, anti-tumorales, anti-angiogénicos o

quimioterapéuticos. Dichos agentes adicionales pueden incluirse en la misma composición o administrarse por separado. Como se describe en el presente documento, pueden utilizarse uno o más anticuerpos anti-CD40 agonistas de la invención como una vacuna o como adyuvantes de una vacuna.

5 Las composiciones de la presente invención pueden estar en una diversidad de formas, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infundibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo de administración y de la aplicación terapéutica que se desee. Las composiciones típicas preferidas están en forma de soluciones inyectables o infundibles, tales como composiciones similares a las utilizadas para inmunización pasiva de seres humanos. El modo de administración preferido es la administración parenteral (por ejemplo intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). El anticuerpo se administra por infusión intravenosa o inyección. También se prefiere administrar el anticuerpo por inyección intramuscular o subcutánea.

15 Las composiciones terapéuticas deberán ser típicamente estériles y estables en las condiciones de fabricación y conservación. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura solicitada adecuada para una alta concentración del fármaco. Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el anticuerpo anti-CD40 en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado con un principio, o una combinación de principios, citados anteriormente, según se necesite, seguido por esterilización con filtro. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contenga un medio de dispersión básico y los otros principios necesarios de los citados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son el secado al vacío y la liofilización que producen un polvo de los principios activos más cualquier principio deseado adicional a partir de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo. La correcta fluidez de una solución puede mantenerse, por ejemplo, utilizando un revestimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en el caso de dispersión y utilizando tensioactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede llevarse a cabo incluyendo en la composición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

20 Los anticuerpos de la presente invención pueden administrarse mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica, aunque en muchas aplicaciones terapéuticas, la vía/modo de administración preferido es subcutáneo, intramuscular o infusión intravenosa. Como apreciará el experto en la materia, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados.

25 Como se describe en el presente documento, el compuesto activo de las composiciones de anticuerpo puede prepararse con un vehículo que protegerá al anticuerpo contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato vinílico de etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los expertos en la técnica conocen muchos procedimientos para la preparación de dichas formulaciones que están patentadas o que se conocen de manera general. Véase, por ejemplo, Sustained and controlled Release Drug Delivery Systems (J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978).

30 Como se describe en el presente documento, un anticuerpo anti-CD40 de la invención puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y otros principios si se desea) también pueden incluirse en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, comprimirse en comprimidos o incorporarse directamente en la dieta del sujeto. Para administración terapéutica oral, los anticuerpos anti-CD40 pueden incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Para administrar un compuesto de la invención que no sea por administración parenteral, puede ser necesario revestir el compuesto, o coadministrar el compuesto, con un material para impedir su inactivación.

35 Como se describe en el presente documento, un anticuerpo anti-CD40 de la invención puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y otros principios si se desea) también pueden incluirse en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, comprimirse en comprimidos o incorporarse directamente en la dieta del sujeto. Para administración terapéutica oral, los anticuerpos anti-CD40 pueden incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Para administrar un compuesto de la invención que no sea por administración parenteral, puede ser necesario revestir el compuesto, o coadministrar el compuesto, con un material para impedir su inactivación.

40 En las composiciones también pueden incorporarse compuestos activos adicionales. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CD40 de la invención se formula conjuntamente, y/o se administra conjuntamente, con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Estos agentes incluyen, anticuerpos que se unen a otras dianas (por ejemplo, anticuerpos que se unen a uno o más factores de crecimiento o citocinas o sus receptores de superficie celular, tal como un anticuerpo anti-CTL4), agentes antineoplásicos, agentes antitumorales, agentes quimioterapéuticos, análogos peptídicos que activan CD40, CD40L soluble, uno o más agentes químicos que activan CD40 y/u otros agentes conocidos en la técnica que pueden mejorar la respuesta inmunitaria contra células tumorales, por ejemplo, IFN- β 1, IL-2, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, IFN- γ , y GM-CSF. Dichas terapias de combinación pueden requerir dosificaciones más bajas del anticuerpo anti-CD40 así como los agentes coadministrados, impidiendo de esta manera posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

45 Los anticuerpos anti-CD40 agonistas de la invención y las composiciones que los incluyen también pueden administrarse en combinación con otros regímenes terapéuticos, en particular, en combinación con tratamiento de radiación.

Las composiciones de la invención pueden incluir una “cantidad terapéuticamente eficaz” o una “cantidad profilácticamente eficaz” de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno de la invención. Una “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o parte de anticuerpo puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, edad, sexo y peso del individuo y la capacidad del anticuerpo o parte del anticuerpo para suscitar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o parte del anticuerpo se sobreexcede por los efectos terapéuticos beneficiosos. Una “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Típicamente, dado que en sujetos se utiliza una dosis profiláctica antes de o en etapas precoces de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, puede administrarse un solo bolo, pueden administrarse diversas dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación, como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente separadas adaptadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación de las formas unitarias de dosificación de la invención se dictaminan por y dependen directamente de (a) las características exclusivas del anticuerpo anti-CD40 o parte de anticuerpo y el efecto terapéutico o profiláctico particular a conseguir y (b) las limitaciones intrínsecas en la técnica de formación de compuestos tal como un anticuerpo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Un intervalo ejemplar, no limitante, de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo o parte de anticuerpo de la invención es de 0,025 a 50 mg/kg, más preferentemente de 0,1 a 50 mg/kg, más preferentemente de 0,1 a 25, de 0,1 a 10 o de 0,1 a 3 mg/kg. Debe observarse que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y gravedad de la afección que vaya a aliviarse. También se entenderá que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con las necesidades individuales y con el criterio profesional de la persona administradora o supervisora de la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación expuestos en el presente documento son únicamente ilustrativos.

En el presente documento también se describen kits que comprenden un anticuerpo anti-CD40 o una parte del anticuerpo de la invención o una composición que comprende dicho anticuerpo. Un kit puede incluir, además del anticuerpo o composición, agentes de diagnóstico o terapéuticos. Un kit también puede incluir instrucciones para su uso en un procedimiento de diagnóstico o terapéutico. En particular, el kit puede incluir el anticuerpo o una composición que lo incluya y un agente de diagnóstico que puede utilizarse en un procedimiento descrito más adelante. Como se describe en el presente documento, el kit también puede incluir el anticuerpo o una composición que lo incluya y uno o más agentes terapéuticos que pueden utilizarse en un procedimiento descrito más adelante.

En el presente documento también se describe el uso de las composiciones para inhibir el crecimiento celular anómalo en un mamífero, comprendiendo la composición una cantidad de un anticuerpo de la invención en combinación con una cantidad de un agente quimioterapéutico, en el que las cantidades del compuesto sal, solvato o profármaco y el agente quimioterapéutico son eficaces entre sí en la inhibición del crecimiento celular anómalo. En la técnica se conocen actualmente muchos agentes quimioterapéuticos. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en inhibidores mitóticos, agentes alquilantes, anti-metabolitos, antibióticos intercalantes, inhibidores de factores de crecimiento, inhibidores del ciclo celular, enzimas, inhibidores de topoisomerasa, modificadores de la respuesta biológica, anti-hormonas, por ejemplo anti-andrógenos y agentes anti-angiogénesis.

Junto con un anticuerpo anti-CD40 de la invención pueden utilizarse agentes anti-angiogénicos, tales como inhibidores de MMP-2 (metaloproteinasa de matriz 2), inhibidores de MMP-9 (metaloproteinasa de matriz 9) e inhibidores COX-II (ciclooxigenasa II). Como ejemplos de inhibidores de COX-II útiles se incluyen CELEBREXTM (alecoxib), valdecoxib, y rofecoxib. Se describen ejemplos de inhibidores de metaloproteinasa de matriz útiles en el documento WO 96/33172 (publicado el 24 de octubre de 1996), en el documento WO 96/27583 (publicado el 7 de marzo de 1996), en la solicitud de patente europea N° 97304971.1 (presentada el 8 de julio de 1997), solicitud de patente europea N° 99308617.2 (presentada el 29 de octubre de 1999), en el documento WO 98/07697 (publicado el 26 de febrero de 1998), documento WO 98/03516 (publicado el 29 de enero de 1998), documento WO 98/34918 (publicado el 13 de agosto de 1998), documento WO 98/34915 (publicado el 13 de agosto de 1998), documento WO 98/33768 (publicado el 6 de agosto de 1998), documento WO 98/30566 (publicado el 16 de julio 1998), publicación de patente europea 606,046 (publicada el 13 de julio 1994), publicación de patente europea 931.788 (publicada el 28 de julio de 1999), documento WO 90/05719 (publicado el 31 de mayo de 1990), documento WO 99/52910 (publicado el 21 de octubre de 1999), documento WO 99/52889 (publicado el 21 de octubre de 1999), documento WO 99/29667 (publicado el 17 de junio 1999), Solicitud Internacional PCT N° PCT/IB98/01113 (presentada el 21 de julio de 1998), Solicitud de Patente Europea N° 99302232.1 (presentada el 25 de marzo de 1999), Solicitud de Patente de Gran

Bretaña N° 9912961.1 (presentada el 3 de junio de 1999), Solicitud Provisional de los Estados Unidos N° 601148,464 (presentada el 12 de agosto de 1999), Patente de Estados Unidos 5.863.949 (expedida el 26 de enero de 1999), Patente de Estados Unidos 5.861.510 (expedida el 19 de enero de 1999) y Publicación de Patente Europea 780.386 (publicada el 25 de junio de 1997). En algunos casos los inhibidores de MMP son aquellos que no demuestran artralgia. En algunos casos, los inhibidores de MMP inhiben selectivamente MMP-2 y/o MMP-9 con respecto a las otras metaloproteinasas de matriz (es decir MMP-1, MMP-3, MMP-4, MMP-5, MMP-6, MMP-7, MMP-8, MMP-10, MMP-11, MMP-12 y MMP-13). Algunos ejemplos específicos de inhibidores de MMP útiles en la presente invención son AG-3340, RO 32-3555, RS 13-0830 y los compuestos indicados en la siguiente lista: ácido 3-[[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfonil]-(1-hidroxicarbamoil-ciclopentil)-amino]-propiónico; hidroxiamida del ácido 3-exo-3-[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfonilamino]-8-oxa-biciclo[3.2.1]octano-3-carboxílico; hidroxiamida del ácido (2R, 3R) 1-[4-(2-cloro-4-fluoro-benciloxi)-bencenosulfonil]-3-hidroxi-3-metil-piperidin-2-carboxílico; hidroxiamida del ácido 4-[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfonil-amino]-tetrahidropiran-4-carboxílico; ácido 3-[[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfonil]-(1-hidroxicarbamoil-ciclobutil)-amino]-propiónico; hidroxiamida del ácido 4-[4-(4-cloro-fenoxi)-bencenosulfonilamino]-tetrahidropiran-4-carboxílico; hidroxiamida del ácido (R) 3-[4-(4-cloro-fenoxi)-bencenosulfonilamino]-tetrahidropiran-3-carboxílico; hidroxiamida del ácido (2R, 3R) 1-[4-(4-fluoro-2-metil-benciloxi)-bencenosulfonil]-3-hidroxi-3-metil-piperidin-2-carboxílico; ácido 3-[[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfonil]-(1-hidroxicarbamoil-1-metil-etil)-amino]-propiónico; ácido 3-[[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfonil]-(4-hidroxicarbamoil-tetrahidropiran-4-il)-amino]-propiónico; hidroxiamida del ácido 3-exo-3-[4-(4-cloro-fenoxi)-bencenosulfonil-amino]-8-oxa-biciclo[3.2.1]octano-3-carboxílico; hidroxiamida del ácido 3-endo-3-[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfonil-amino]-8-oxa-biciclo[3.2.1]octano-3-carboxílico; e hidroxiamida del ácido (R) 3-[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfonil-amino]-tetrahidrofuran-3-carboxílico y sales y solvatos de dichos compuestos farmacéuticamente aceptables.

Un compuesto de la invención también puede utilizarse con inhibidores de transducción de señales, tales como agentes que pueden inhibir respuestas EGF-R (receptores de factores de crecimiento epidérmicos), tales como anticuerpos EGF-R, anticuerpos EGF y moléculas que son inhibidores de EGF-R; inhibidores de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), tales como receptores de VEGF y moléculas que pueden inhibir VEGF; e inhibidores del receptor de erbB2, tales como moléculas orgánicas o anticuerpos que se unen al receptor de etbB2, por ejemplo, HERCEPTINTM (Genentech, Inc.). Los inhibidores de EGF-R se describen, por ejemplo, en el documento WO 95/19970 (publicado el 27 de julio de 1995), documento WO 98/14451 (publicado el 9 de abril de 1998), documento WO 98/02434 (publicado el 22 de enero de 1998) y en la Patente de Estados Unidos 5.747.498 (expedida el 5 de mayo de 1998) y dichas sustancias pueden utilizarse como se describe en el presente documento. Como agentes que inhiben el EGF-R se incluyen, pero sin limitación, los anticuerpos monoclonales C225 y el Mab anti-EGFR 22 (ImClone Systems Incorporated), ABX-EGF (Abgenix/Cell Genesys), EMD-7200 (Merck KgaA), EMD-5590 (Merck KgaA), MDX-447/H-477 (Medarex Inc. y Merck KgaA) y los compuestos ZD-1834, ZD-1838 y ZD-1839 (AstraZeneca), PKI-166 (Novartis), PKI-166/CGP-75166 (Novartis), PTK 787 (Novartis), CP 701 (Cephalon), leflunomida (Farmacia/Sugen), CI-1033 (Warner Lambert Parke Davis), CI-1033/PD 183,805 (Warner Lambert Parke Davis), CL-387,785 (Wyeth-Ayerst), BBR-1611 (Boehringer Mannheim GmbH/Roche), Naamidina A (Bristol Myers Squibb), RC-3940-II (Farmacia), BIBX-1382 (Boehringer Ingelheim), OLX-103 (Merck & Co.), VRCTC-310 (Ventech Research), toxina de fusión EGF (Seragen Inc.), DAB-389 (Scragen/Lilgand), ZM-252808 (Imperial Cancer Research Fund), RG-50864 (INSERM), LFM-A12 (Parker Hughes-Cancer Center), WHI-P97 (Parker Hughes Cancer Center), GW-282974 (Glaxo), KT-8391 (Kyowa Hakko) y la vacuna EGF-R (York Medical/Centro de Immunología Molecular (CIM)). Estos y otros agentes inhibidores del EGF-R pueden utilizarse como se describe en el presente documento.

Los inhibidores de VEGF, por ejemplo SU-5416 y SU-6668 (Sugen Inc.), SH-268 (Schering) y NX-1838 (NeXstar) también pueden combinarse con el compuesto de la presente invención. Se describen inhibidores de VEGF, por ejemplo, en el documento WO 99/24440 (publicado el 20 de mayo de 1999), en la Solicitud Internacional PCT PCT/IB99/00797 (presentada el 3 de mayo de 1999), en el documento WO 95/21613 (publicado el 17 de agosto de 1995), documento WO 99/61422 (publicado el 2 de diciembre de 1999), en la Patente de Estados Unidos 5.834.504 (expedida el 10 de noviembre de 1998), documento WO 98/50356 (publicado el 12 de noviembre de 1998), Patente de Estados Unidos 5.883,113 (expedida el 16 de marzo de 1999), Patente de Estados Unidos 5.886.020 (expedida el 23 de marzo de 1999), Patente de Estados Unidos 5.792.783 (expedida el 11 de agosto de 1998), documento WO 99/10349 (publicado el 4 de marzo de 1999), documento WO 97/32856 (publicado el 12 de septiembre de 1997), documento WO 97/22596 (publicado el 26 de junio de 1997), documento WO 98/54093 (publicado el 3 de diciembre de 1998), documento WO 98/02438 (publicado el 22 de enero de 1998), documento WO 99/16755 (publicado el 8 de abril 1999) y documento WO 98/02437 (publicado el 22 de enero de 1998). Otros ejemplos de algunos inhibidores específicos de VEGF útiles en este aspecto, descritos en el presente documento, son IM862 (Cytran Inc.); el anticuerpo monoclonal anti-VEGF de Genentech, Inc.; una angioenzima, una ribozima sintética de Ribozyme y Chiron. Estos y otros inhibidores de VEGF pueden utilizarse como se describe en el presente documento. Los inhibidores de receptores de ErbB2, tales como GW-282974 (Glaxo Wellcome plc), y los anticuerpos monoclonales AR-209 (Aronex Pharmaceuticals Inc.) y 2B-1 (Chiron), puede combinarse adicionalmente con el compuesto de la invención, por ejemplo los indicados en el documento WO 98/02434 (publicado el 22 de enero de 1998), documento WO 99/35146 (publicado el 15 de julio de 1999), documento WO 99/35132 (publicado el 15 de julio de 1999), documento WO 98/02437 (publicado el 22 de enero de 1998), documento WO 97/13760 (publicado el 17 de abril de 1997), documento WO 95/19970 (publicado el 27 de julio de 1995), Patente de Estados Unidos 5.587.458 (expedida el 24 de diciembre de 1996) y Patente de Estados Unidos 5.877.305 (expedida el 2 de marzo de 1999).

Los inhibidores de receptores de ErbB2 útiles según los aspectos descritos en el presente documento también se describen en la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 60/117.341, presentada el 27 de enero de 1999 y en la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 60/117,346, presentada el 27 de enero de 1999. Los compuestos y sustancias inhibitoras del receptor de erbB2 descritos en las solicitudes PCT, Patentes de Estados Unidos y Solicitudes Provisionales de Estados Unidos mencionados anteriormente, así como otros compuestos y sustancias que inhiben el receptor de erbB2, pueden utilizarse con el compuesto de la presente invención como se describe en el presente documento.

Como agentes anti-supervivencia se incluyen anticuerpos anti-IGF-IR y agentes anti-integrina, tales como anticuerpos anti-integrina.

10 Procedimientos de uso diagnóstico

En el presente documento también se describen procedimientos de diagnóstico. Los anticuerpos anti-CD40 pueden utilizarse para detectar CD40 en una muestra biológica *in vivo* o *in vitro*. Específicamente se describe un procedimiento para diagnosticar la presencia o la localización de un tumor que exprese CD40 en un sujeto que lo necesite, que comprende las etapas de inyectar al sujeto el anticuerpo, determinar la expresión de CD40 en el sujeto localizando donde se ha unido el anticuerpo, comparar la expresión en el sujeto con la de un patrón o sujeto de referencia normal, y diagnosticar la presencia o localización del tumor.

Los anticuerpos anti-CD40 pueden utilizarse en un inmunoensayo convencional, incluyendo, un ELISA, un RIA, FACS, inmunohistoquímica tisular, transferencia de Western o inmunoprecipitación. Los anticuerpos anti-CD40 de la invención pueden utilizarse para detectar CD40 de seres humanos. En otra realización, los anticuerpos anti-CD40 pueden utilizarse para detectar CD40 de primates del Viejo Mundo, tales como monos cinomolgos y rhesus, chimpancés y simios. En el presente documento también se describe un procedimiento para detectar CD40 en una muestra biológica que comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo anti-CD40 de la invención y detectar el anticuerpo unido. Como se describe, el anticuerpo anti-CD40 puede marcarse directamente con un marcador detectable. Como también se describe, el anticuerpo anti-CD40 (el anticuerpo primario) puede no marcarse y un segundo anticuerpo u otra molécula que puede unirse al anticuerpo anti-CD40 se marca; como conoce bien un experto en la técnica, se selecciona un anticuerpo secundario que puede unirse específicamente a la especie y clase particular del anticuerpo primario. Por ejemplo, si el anticuerpo anti-CD40 es una IgG humana, entonces el anticuerpo secundario podría ser una IgG anti-humana. Otras moléculas que pueden unirse a anticuerpos incluyen la proteína A y la proteína G, ambas de venta en el mercado de, por ejemplo, Pierce Chemical Co.

Anteriormente se han descrito marcadores adecuados para el anticuerpo o anticuerpo secundario e incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Como ejemplos de enzimas adecuadas se incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; como ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados se incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; como ejemplos de materiales fluorescentes adecuados se incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y como ejemplos de materiales radioactivos adecuados se incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

En el presente documento también se describe que el CD40 puede someterse a ensayo en una muestra biológica mediante un inmunoensayo competitivo utilizando patrones de CD40 marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-CD40 no marcado. En este ensayo, la muestra biológica, los patrones de CD40 marcados y el anticuerpo anti-CD40 se combinan y se determina la cantidad de patrón de CD40 marcado unido al anticuerpo no marcado. La cantidad de CD40 en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón de CD40 marcado unido al anticuerpo anti-CD40.

Pueden utilizarse los inmunoensayos descritos anteriormente para diversos propósitos. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD40 pueden utilizarse para detectar CD40 en células en cultivo celular. Específicamente, los anticuerpos anti-CD40 pueden utilizarse para determinar la cantidad de CD40 sobre la superficie de células que se han tratado con diversos compuestos. Este procedimiento puede utilizarse para identificar compuestos que sean útiles para activar o inhibir CD40. De acuerdo con este procedimiento, una muestra de células se trata con un compuesto de ensayo durante un período de tiempo mientras que otra muestra se deja sin tratar. Si va a medirse el nivel total de CD40, las células se someten a lisis y el nivel de CD40 total se mide utilizando uno de los inmunoensayos descritos anteriormente. El nivel total de CD40 en las células tratadas frente a las no tratadas se compara para determinar el efecto del compuesto de ensayo.

Un inmunoensayo muy apropiado para medir los niveles de CD40 totales es un ELISA o transferencia de Western. Si va a medirse el nivel de CD40 en la superficie celular, las células no se someten a lisis y los niveles de CD40 en la superficie celular se miden utilizando uno de los inmunoensayos descritos anteriormente. Otro inmunoensayo para determinar los niveles de CD40 en la superficie celular incluye las etapas de marcar las proteínas de superficie celular con un marcador detectable, tal como biotina o ^{125}I , inmunoprecipitar el CD40 con un anticuerpo anti-CD40 y después detectar el CD40 marcado. Otro inmunoensayo para determinar la localización de

CD40, por ejemplo, niveles en la superficie celular, es mediante el uso de inmunohistoquímica. En la técnica se conocen bien procedimientos tales como ELISA, RIA, transferencia de Western, inmunohistoquímica, marcado de superficie celular de proteínas de membrana integral e inmunoprecipitación. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, citados anteriormente. Además, los inmunoensayos pueden graduarse para una exploración a alto rendimiento para ensayar una gran cantidad de compuestos con respecto a la activación o inhibición de CD40.

Los anticuerpos anti-CD40 de la invención también pueden utilizarse para determinar los niveles de CD40 en un tejido o en células derivadas del tejido. En algunas realizaciones, el tejido es un tejido enfermo. Como se describe en el presente documento, el tejido puede ser un tumor o una biopsia del mismo. En algunas variaciones del procedimiento, al paciente se le extirpa un tejido o una biopsia del mismo. Después, el tejido o la biopsia se utilizan en un inmunoensayo para determinar, por ejemplo, niveles de CD40 totales, niveles de CD40 en la superficie celular o la localización de CD40 mediante los procedimientos descritos anteriormente.

El procedimiento de diagnóstico descrito anteriormente puede utilizarse para determinar si un tumor expresa altos niveles de CD40, lo cual que podría ser indicativo de que el tumor es una diana para el tratamiento con anticuerpos anti-CD40. Además, puede utilizarse el mismo procedimiento para controlar el efecto del tratamiento con anticuerpos anti-CD40 detectando muerte celular en el tumor. El procedimiento de diagnóstico también puede utilizarse para determinar si un tejido o una célula expresa niveles insuficientes de CD40 o CD40 activado, y por lo tanto es un candidato para el tratamiento con anticuerpos anti-CD40 activadores, CD40L y/u otros agentes terapéuticos para aumentar los niveles o la actividad de CD40.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden utilizarse *in vivo* para identificar tejidos y órganos que expresan CD40. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD40 se utilizan para identificar tumores que expresan CD40. Una ventaja del uso de los anticuerpos anti-CD40 humanos de la presente invención es que pueden utilizarse de manera segura *in vivo* sin suscitar ninguna respuesta inmunitaria contra al anticuerpo después de la administración, a diferencia de los anticuerpos de origen no humano o con anticuerpos no humanizados.

El procedimiento comprende las etapas de administrar a un paciente que necesite dicho ensayo de diagnóstico, un anticuerpo anti-CD40 marcado de manera detectable o una composición que lo comprenda y someter al paciente a análisis de formación de imágenes para determinar la localización de los tejidos que expresan CD40. Los análisis de formación de imágenes se conocen bien en la técnica médica e incluyen, sin limitación, análisis de rayos X, formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) o tomografía computarizada (CE). El anticuerpo puede marcarse con cualquier agente adecuado para la formación de imágenes *in vivo*, por ejemplo, con un agente de contraste, tal como bario, que puede utilizarse para análisis de rayos x, o con un agente de contraste magnético, tal como quelato de gadolinio, que puede utilizarse para MRI o CE. Otros agentes de marcado incluyen, sin limitación, radioisótopos, tales como ⁹⁹Tc. Como se describe en el presente documento, el anticuerpo anti-CD40 no se marcará y se realizará formación de imágenes administrando un anticuerpo secundario u otra molécula que sea detectable y que pueda unirse al anticuerpo anti-CD40. En una variación, se obtiene una biopsia del paciente para determinar si el tejido de interés expresa CD40.

Procedimientos de uso terapéutico

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD40 de la invención para su uso en terapia.

Puede administrarse un anticuerpo anti-CD40 agonista humano de la invención a un mamífero no humano o a un ser humano que exprese un CD40 que reaccione en cruzado. El anticuerpo puede administrarse a dicho mamífero no humano (es decir, un primate, un mono cinomolgo o rhesus) con fines veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Dichos modelos animales son útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la presente invención.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 se administra a un sujeto que padece inmunodeficiencia primaria y/o combinada, incluyendo inmunodeficiencia dependiente de CD40 con el síndrome de hiper-IgM, inmunodeficiencia variable común, agammaglobulinemia de Bruton, deficiencias de la subclase IgG y SCID asociada al cromosoma X (mutaciones comunes de cadena gamma). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 se administra para tratar a un sujeto que está inmunodeprimido, por ejemplo, debido a quimioterapia o que tiene una enfermedad inmunodebilitante, incluyendo cualquier enfermedad de inmunodeficiencia adquirida, tal como VIH. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 se administra para mejorar la inmunidad de un sujeto de edad avanzada. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 se administra para tratar a un sujeto que tiene una infección bacteriana, viral, fúngica o parasitaria. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD40 agonista humano de la invención puede administrarse profilácticamente a un sujeto que, debido a su edad, enfermedad o mala salud general, es susceptible a infecciones para prevenir o reducir la cantidad o gravedad de infecciones.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 se administra a un sujeto que tiene un trastorno hiperproliferativo.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 se administra para tratar a un sujeto que tiene un tumor. En algunas realizaciones, el tumor es CD40 positivo. En algunas realizaciones, el tumor es un tumor CD40 negativo. El tumor puede ser un tumor sólido o un tumor no sólido, tal como linfoma. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD40 se administra a un paciente que tiene un tumor que es canceroso. En algunas realizaciones, el anticuerpo

inhibe la proliferación de células cancerosas, inhibe o impide un aumento del peso o volumen tumoral, y/o produce una disminución del peso o volumen tumoral.

5 Los pacientes que pueden tratarse con anticuerpos anti-CD40 o con partes de anticuerpos de la invención incluyen pacientes a los cuales se les ha diagnosticado que tienen cáncer cerebral, cáncer pulmonar, cáncer óseo, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza y cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer de mama, tumores ginecológicos (por ejemplo, sarcomas uterinos, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de la vagina o carcinoma de la vulva),
 10 cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino (por ejemplo, cáncer de las glándulas tiroideas, paratiroides o adrenales), sarcomas de tejidos blandos, leucemia, mieloma, mieloma múltiple, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, leucemia aguda o crónica, tumores sólidos infantiles, enfermedad de Hodgkin, linfomas linfocíticos, linfoma no Hodgkin, cáncer de vejiga, cáncer hepático, cáncer renal, cáncer de riñón o uréter (por ejemplo, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal), o neoplasmas del sistema nervioso central (por ejemplo, linfoma primario del SNC, tumores del eje espinal, gliomas del tronco encefálico o adenomas de la pituitaria), glioma o fibrosarcoma.

15 El anticuerpo puede administrarse de tres veces al día a una vez cada seis meses, y preferentemente puede administrarse mediante una vía oral, mucosa, bucal, intranasal, inhalable, intravenosa, subcutánea, intramuscular, parenteral, intratumoral, transdérmica o tópica. El anticuerpo también puede administrarse de manera continuada mediante una minibomba. El anticuerpo generalmente se administrará siempre que el tumor esté presente con tal de
 20 que el anticuerpo ocasione la detención del desarrollo del tumor o cáncer o la disminución del peso o volumen del mismo. La dosificación del anticuerpo generalmente estará en el intervalo de 0,025 a 50 mg/kg, más preferentemente de 0,1 a 50 mg/kg, más preferentemente de 0,1-20 mg/kg, de 0,1-10 mg/kg, de 0,1-5 mg/kg o incluso más preferentemente de 0,1-2 mg/kg. El anticuerpo también puede administrarse profilácticamente.

25 Como se describe en el presente documento el anticuerpo anti-CD40 se administra como parte de un régimen terapéutico que incluye uno o más fármacos o moléculas antineoplásicas adicionales a un paciente que tiene un trastorno hiperproliferativo, tal como un cáncer o un tumor. Como agentes antitumorales ejemplares se incluyen, pero sin limitación, inhibidores mitóticos, agentes alquilantes, antimetabolitos, agentes intercalantes, inhibidores de factores de crecimiento, inhibidores del ciclo celular, enzimas, inhibidores de topoisomerasa, modificadores de la respuesta biológica, anti-hormonas, inhibidores quinasa, inhibidores de la metaloproteasa de la matriz, agentes
 30 terapéuticos genéticos y antiandrógenos. En realizaciones más preferidas, el anticuerpo anti-CD40 se administra con un agente antineoplásico, tal como adriamicina o taxol. En algunas realizaciones preferidas, la terapia anti-CD40 se realiza junto con radioterapia, quimioterapia, terapia fotodinámica, cirugía u otra inmunoterapia. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 se administra con uno o más anticuerpos adicionales. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CD40 puede administrarse con anticuerpos que se sabe que inhiben la proliferación de células cancerosas o tumorales. Dichos anticuerpos incluyen, pero sin limitación, un anticuerpo que inhibe CTLA4, el receptor de erbB2, EGF-R, IGF-1R, CD20 o
 35

40 Como se describe en el presente documento, el anticuerpo anti-CD40 puede marcarse con un marcador radioactivo, una inmunotoxina o una toxina, o es una proteína de fusión que comprende un péptido tóxico. El anticuerpo anti-CD40 o la proteína de fusión con anticuerpo anti-CD40 dirige al marcador radioactivo, a la inmunotoxina, toxina o al péptido tóxico contra la célula tumoral o cancerosa. En una realización preferida, la célula tumoral o cancerosa internaliza el marcador radioactivo, la inmunotoxina, la toxina o el péptido tóxico después de que el anticuerpo anti-CD40 se una a CD40 en la superficie de la célula.

45 En otro aspecto, el anticuerpo anti-CD40 puede utilizarse terapéuticamente para inducir en un paciente la apoptosis de células específicas. En muchos casos, las células diana para la apoptosis son células cancerosas o tumorales. Por tanto, la invención proporciona un procedimiento de inducción de apoptosis administrando un anticuerpo anti-CD40 a un paciente que lo necesite.

50 En otro aspecto, en el presente documento se describe un procedimiento de administración de un anticuerpo anti-CD40 activador a un paciente para aumentar la actividad de CD40. Un anticuerpo anti-CD40 se administra con uno o más factores distintos que aumenten la actividad de CD40. Dichos factores incluyen CD40L, y/o análogos de CD40L que activan a CD40.

El anticuerpo anti-CD40 también puede administrarse con uno o más agentes adicionales potenciadores de inmunidad, que incluyen, sin limitación, IFN- β 1, IL-2, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, IL- 23, IFN- γ y GM-CSF.

55 También puede utilizarse un anticuerpo anti-CD40 agonista humano de la invención como un adyuvante para potenciar la eficacia de una vacuna. Cuando se usa de esta manera, el anticuerpo anti-CD-40 activa a CD40 en las células presentadoras de antígeno, incluyendo linfocitos B, células dendríticas y monocitos así como potenciando la producción de moléculas inmunomoduladoras, tales como citocinas y quimiocinas. El efecto inmunoestimulador del anticuerpo potencia la respuesta inmunitaria del sujeto vacunado contra el antígeno de la vacuna.

En otro aspecto, en el presente documento se describe un procedimiento para generar una vacuna con células dendríticas para el cáncer o para inmunoterapia con células dendríticas. De acuerdo con el procedimiento, las células dendríticas de un paciente con cáncer se cultivan durante 1-5 días con lisado u homogeneizado tumoral, las células tumorales se destruyen por radiación u otros medios, o antígenos específicos tumorales (por ejemplo, péptidos, idiotipos) y 1-10 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti-CD40. Las células dendríticas impulsadas por antígenos tumorales se reinyectan en el paciente para estimular respuestas inmunitarias anti-tumorales, particularmente respuestas anti-LCT tumorales. Para su uso en el procedimiento las células dendríticas derivadas de monocitos puede obtenerse de una muestra de sangre periférica mediante por en IL-4 y GM-CSF. Las células dendríticas también pueden derivar de la médula ósea de un paciente por purificación magnética o clasificación de células CD34 positivas, seguido por cultivo en IL-4 y GM-CSF.

Terapia génica

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden administrarse a un paciente que lo necesite mediante terapia génica. La terapia puede ser *in vivo* o *ex vivo*. En una realización preferida, a un paciente se le administra moléculas de ácido nucleico que codifican tanto una cadena ligera como una cadena pesada. En el presente documento también se describen moléculas de ácido nucleico que pueden administrarse de tal manera que se integran de manera estable en los cromosomas de linfocitos B debido a que estas células están especializadas para producir anticuerpos. En el presente documento también se describen linfocitos B precursores que pueden transfectarse o infectarse *ex vivo* y volver a trasplantarse en un paciente que lo necesite. En el presente documento también se describe que los linfocitos B u otras células se infectan *in vivo* utilizando un virus que se sabe que infecta el tipo de célula de interés. Los vectores típicos utilizados para terapia génica incluyen liposomas, plásmidos y vectores virales. Son vectores virales ejemplares los retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados. Después de la infección *in vivo* o *ex vivo*, los niveles de expresión de anticuerpo pueden controlarse tomando una muestra del paciente tratado y utilizando cualquier inmunoensayo conocido en la técnica o descrito en el presente documento.

Como se describe en el presente documento, el procedimiento de terapia génica comprende las etapas de administrar una molécula de ácido nucleico aislada que codifique la cadena pesada o una parte de unión a antígeno de la misma de un anticuerpo anti-CD40 y expresar la molécula de ácido nucleico. En el presente documento también se describe que el procedimiento de terapia génica comprende las etapas de administrar una molécula de ácido nucleico aislada que codifique la cadena ligera o una parte de unión a antígeno de la misma de un anticuerpo anti-CD40 y expresar la molécula de ácido nucleico. Otro procedimiento descrito en el presente documento es que el procedimiento de terapia génica comprende las etapas de administrar una molécula de ácido nucleico aislada que codifique la cadena pesada o una parte de unión de antígeno de la misma y una molécula de ácido nucleico aislada que codifique la cadena ligera o la parte de unión a antígeno de la misma de un anticuerpo anti-CD40 de la invención y expresar las moléculas de ácido nucleico. El procedimiento de terapia génica también comprende la etapa de administrar otro agente anticanceroso, tal como taxol o adriamicina.

Para que la presente invención pueda comprenderse mejor, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos y de ningún modo pretenden limitar el ámbito de invención.

Ejemplo I

Generación de hibridomas productores de anticuerpos anti-CD40

Los anticuerpos de la invención se prepararon, se seleccionaron y se sometieron a ensayo de la siguiente manera:

40 *Inmunización y generación de hibridomas*

Se inmunizaron Xenomice™ de ocho a diez semanas de vida por vía intraperitoneal o en sus almohadillas plantares traseras con una proteína de fusión CD40-IgG (10 $\mu\text{g/dosis/ratón}$) o con células 300.19-CD40 que es una línea celular transfectada que expresa el CD40 humano en su membrana plasmática (10×10^6 células/dosis/ratón). Esta dosis se repitió de cinco a siete veces durante un período de tres a ocho semanas. Cuatro días antes de la fusión, los ratones recibieron una inyección final del dominio extracelular de CD40 humano en PBS. Se fusionaron los linfocitos de bazo y ganglios linfáticos de ratones inmunizados con la línea celular no secretora de mieloma P3-X63-Ag8.653, y las células fusionadas se sometieron a selección con HAT, como se ha descrito anteriormente (Galfre y Milstein, *Methods Enzymol.* 73:3-46, 1981). Se recuperó un panel de hibridomas, todos ellos secretores de anticuerpos IgG2 κ humanos específicos de CD40. Se seleccionaron once hibridomas para estudio posterior y se denominaron 3.1.1, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.29.1 y 24.2.1.

Los hibridomas 3.1.1, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1 y 21.4.1 se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) de acuerdo con el Tratado de Budapest, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20.110-2209, el 6 de agosto del 2001. Los hibridomas 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.29.1 y 24.2.1 se depositaron en la ATCC el 16 de julio del 2002. Los hibridomas se habían asignado a los siguientes números de depósito:

55

<u>Hibridoma</u>	<u>Nº de Depósito</u>
3.1.1 (LN 15848)	PTA-3600
7.1.2 (LN 15849)	PTA-3601
10.8.3 (LN 15850)	PTA-3602
15.1.1 (LN 15851)	PTA-3603
21.4.1 (LN 15853)	PTA-3605
21.2.1 (LN 15874)	PTA-4549
22.1.1 (LN 15875)	PTA-4550
23.5.1 (LN 15855)	PTA-4548
23.25.1 (LN 15876)	PTA-4551
23.28.1 (LN 15877)	PTA-4552
23.29.1 (LN 15878)	PTA-4553
24.2.1 (LN 15879)	PTA-4554

Ejemplo II

Secuencias de anticuerpos anti-CD40 preparadas de acuerdo con la invención

5 Para analizar la estructura de los anticuerpos producidos de acuerdo con la invención, se clonaron ácidos nucleicos que codificaban fragmentos de cadena pesada y ligera de hibridomas productores de anticuerpos anti-CD40 monoclonales. La clonación y secuenciación se realizó de la siguiente manera.

10 Se aisló ARNm poli(A)⁺ de aproximadamente 2×10^5 células de hibridoma derivadas de ratones Xenomouse™ inmunizados con CD40 humano, como se ha descrito en el Ejemplo I, utilizando un kit Fast-Track (Invitrogen). A continuación se realizó por PCR la generación de ADNc cebado al azar. Se utilizaron cebadores de la región variable específicos de la familia V_H humana o V_κ humana (Marks y col., "Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes." Eur. J. Immunol. 21:985-991 (1991)) o un cebador V_H humano universal, MG-30, CAGGTGCAGCTGGAGCAGTCIGG (SEC ID N°: 118), junto con cebadores específicos para la región constante C_{J2} humana, MG-40d, 5'-GCTGAGGGAGTAGAGTCCTGAGGA-3' (SEC ID N°: 119) o región constante C_κ (hκP2; como se describe previamente en Green y col, 1994). Se obtuvieron moléculas de ácido nucleico que codificaban transcritos de cadena ligera kappa y pesada humana a partir de los hibridomas productores de anti-CD40 por secuenciación directa de los productos de la PCR generados a partir de ARN poli (A⁺) utilizando los cebadores descritos anteriormente. También se clonaron los productos de la PCR en pCRII utilizando un kit de clonación TA (Invitrogen) y se secuenciaron ambas cadenas utilizando kits de secuenciación dye-terminator de Prism y una secuenciadora ABI 377. Se analizaron todas las secuencias por alineamientos con respecto al "directorio de secuencias V BASE" (Tomlinson y col, MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, RU) utilizando los programas informáticos MacVector y Geneworks.

25 Adicionalmente, los anticuerpos monoclonales 3.1.1, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.28.1, 23.29.1 y 24.2.1 se sometieron a clonación y secuenciación de ADN de longitud completa. Para dicha secuenciación, se aisló ARN de aproximadamente 4×10^6 células de hibridoma utilizando el kit de aislamiento de ARN RNeasy de QIAGEN (QIAGEN). El ARNm se transcribió de manera inversa utilizando oligo-dT (18) y el kit RT/PCR de Advantage (Clontech). Se usó V Base para diseñar cebadores de amplificación directos que incluía sitios de restricción, secuencia Kozak óptima, el sitio de inicio ATG y parte de la secuencia señal de la cadena pesada. La Tabla 1 indica los cebadores de amplificación directos usados para secuenciar los clones de anticuerpos.

30

TABLA 1

Clon	Cadena pesada cebador directo
3.1.1	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGACCGCCACCATGGAGTTT GGGCTGAGCTG-3' (SEC ID N°: 120)
7.1.2	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGACCGCCACCATGGAGTTT GGGCTGAGCTG-3' (SEC ID N°: 121)
10.8.3	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGAAACAC CTGTGGTTCTTCC-3' (SEC ID N°: 122)
15.1.1	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGAAACAT CTGTGGTTCTTCC 3' (SEC ID N°: 123)
21.4.1	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGGACTGG ACCTGGAGGATCC-3' (SEC ID N°: 124)
21.2.1	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGACCGCCACCATGGA GTTTGGGCTGAGCTG-3' (SEC ID N°: 128)
22.1.1	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGACCGCCACCATGGAG TTTGGGCTGAGCTG-3' (SEC ID N°: 129)
23.5.1	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGACCGCCACCATGGAG TTTGGGCTGAGCTG-3' (SEC ID N°: 130)
23.28.1	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGAAA CATCTGTGGTTCTTCC-3' (SEC ID N°: 131)
23.29.1	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGACCGCCACCATGGAG TTTGGGCTGAGCTG-3' (SEC ID N°: 132)
24.2.1	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGAA ACATCTGTGGTTCTTCC-3' (SEC ID N°: 133)

Se usó el mismo procedimiento para diseñar un cebador que incluía las secuencias codificantes 3', el codón de terminación de la región constante de IgG2, (5'-TTCTCTGATCAGAATTCC TATCATTACCCGGAGACAGGGAGAG-3') (SEC ID N°: 125) y sitios de restricción.

- 5 También se usó el mismo procedimiento para diseñar un cebador alrededor del sitio de inicio ATG de la cadena kappa: (5'-CTTCAAGCTTACCCGGGCCACCATGAGGCTCC CTGCTCAGC-3') (SEC ID N°: 126). En el sitio de inicio ATG se añadió una secuencia Kozak óptima (CCGCCACC) en la posición 5'. Este cebador se usó para clonar por PCR las cadenas ligeras de los siguientes clones de anticuerpos: 3.1.1, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1 y 23.29.1. Se usó un segundo cebador directo 5'-TCTTC
- 10 AAGCTTGCCCGGGCCCGCCACCATGAAACCCAGCGCAG-3' (SEC ID N°: 134) para clonar las cadenas ligeras de los clones 23.28.1 y 24.2.1. También se usó el mismo procedimiento para diseñar un cebador alrededor del codón de terminación de la región constante kappa (5'-TTCTTTGATCAGAATTCTCACTAACA
- 15 TCCCTGTTGAAGC-3') (SEC ID N°: 127). Se usaron los pares de cebadores para ampliar los ADNc utilizando el kit PCR de alta fidelidad de Advantage (Clontech). La secuencia del producto de la PCR se obtuvo por secuenciación directa utilizando técnicas convencionales (por ejemplo, cebador de tránsito) utilizando los kits de secuenciación dye-terminator y una secuenciadora ABI. El producto de la PCR se clonó en un vector de expresión de mamífero y se secuenciaron clones para confirmar mutaciones somáticas. Para cada clon, se verificó la secuencia en ambas cadenas en al menos tres reacciones.

Análisis de utilización de genes

La Tabla 2 explica la utilización de genes mostrada por clones de anticuerpos de hibridomas seleccionados de acuerdo con la invención:

TABLA 2

Utilización de genes de cadena pesada y ligera					
Clon	Cadena Pesada			Cadena Ligera Kappa	
	V _H	D	JH	VK	JK
3.1.1	(3-30 +) DP-49	D4 + DIR3	JH6	A3/A19 (DPK-15)	JK1
7.1.2	(3-30 +) DP-49	DIR5 + D1-26	JH6	A3/A19 (DPK-15)	JK1
10.8.3	(4.35) VIV-4	DIR3	JH6	L5 (DP5)	JK4
15.1.1	(4-59) DP-71	D4-23	JH4	A3/A19 (DPK-15)	JK2
21.4.1	(1-02) DP-75	DLR1	JH4	L5 (DP5)	JK4
21.2.1	(3-30 +) DP-49	DIR3 + D6-19	JH4	A3/A19 (DPK-15)	JK23
22.1.1	(3-30 +) DP-49	D1-1	JH6	A3/A19 (DPK-15)	JK1
23.5.1	(3-30 +) DP-49	D4-17	JH6	A3/A19 (DPK-15)	JK1
23.28.1	(4-59) DP-71	DIR1 + D4-17	JH5	A27 (DPK-22)	JK3
23.29.1	(3-30.3) DP-46	D4-17	JH6	A3/A19 (DPK-15)	JK1
24.2.1	(4-59) DP-71	DIR1 + D4-17	JH5	A27 (DPK-22)	JK3

5 Análisis de secuencia y mutación

Como se apreciará, el análisis de utilización de genes proporciona sólo una visión general limitada de la estructura de los anticuerpos. Dado que los linfocitos B en animales Xenomouse™ generan estocásticamente transcritos de cadena ligera V-J kappa o de cadena pesada V-D-J, existen numerosos procesos secundarios que se producen, incluyendo, sin limitación, hipermutación somática, deleciones, N adiciones, y extensiones CDR3. Véase, por ejemplo, Mendez y col, Nature Genetics 15:146-156 (1997) y la Publicación de Patente Internacional WO 98/24893. Por consiguiente, para examinar adicionalmente la estructura de los anticuerpos, se generaron secuencias de aminoácidos previstas de los anticuerpos a partir de los ADNc obtenidos de los clones. La Tabla A proporciona los identificadores de secuencia para cada una de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos previstas de los anticuerpos secuenciados.

10 Las Tablas 3-7 proporcionan las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos previstas de las cadenas ligera kappa y pesada de los anticuerpos 3.1.1 (Tabla 3), 7.1.2 (Tabla 4), 10.8.3 (Tabla 5), 15.1.1 (Tabla 6) y 21.4.1 (Tabla 7).

Las Tablas 8-13 proporcionan las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos previstas del dominio variable de la cadena pesada y cadena ligera kappa de los anticuerpos 21.2.1 (Tabla 8), 22.1.1 (Tabla 9), 23.5.1 (Tabla 10), 23.28.1 (Tabla 11), 23.29.1 (Tabla 12) y 24.2.1 (Tabla 13).

20 La secuencia de ADN de la secuenciación de longitud completa del anticuerpo monoclonal 23.28.1 difiere de las secuencias de ADN obtenidas de la secuenciación de la región V_H del producto PCR inicial en un par de bases (C por G), dando como resultado un cambio de resto 16 de la cadena pesada natural de D por E.

25 Las Tablas 14-19 proporcionan las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos previstas de las cadenas ligera kappa y pesada de los anticuerpos 21.2.1 (Tabla 14), 22.1.1 (Tabla 15), 23.5.1 (Tabla 16), 23.28.1 (Tabla 17), 23.29.1 (Tabla 18) y 24.2.1 (Tabla 19). En las Tablas, la secuencia del péptido señal (o las bases que la codifican) se indican subrayadas.

30 Se generaron dos anticuerpos mutados, 22.1.1 y 23.28.1. La cadena pesada del anticuerpo 22.1.1 se mutó para cambiar un resto de cisteína en la posición 109 por un resto de alanina. Al clon mutado se le denominó 22.1.1H-C019A. La cadena ligera del anticuerpo 23.28.1 en la posición 92 se mutó también para cambiar un resto de cisteína por un resto de alanina. Al clon mutado se le denominó 23.28.1L-C92A.

La mutagénesis de restos específicos se realizó diseñando cebadores y utilizando el kit de mutagénesis dirigida QuickChange de Stratagene, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las mutaciones se confirmaron por secuenciación automatizada y los insertos mutagenizados se subclonaron en vectores de expresión.

5 La Tabla 20 proporciona las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena pesada mutada del anticuerpo 22.1.1H-C109A. La Tabla 21 proporciona las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena ligera mutada del anticuerpo 23.28.1. Los codones de ADN mutados se muestran en cursiva. El resto de aminoácido mutado se indica en negrita.

Tabla 3: secuencias de ADN y proteína del anticuerpo 3.1.1

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
Secuencia de ADN de cadena pesada	<p><u>ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTCGTTGC</u> <u>TCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGT</u>CAGGTGCAGCTG GTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGG AGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTCAGTAGTTATGGCATGCACTGGGTCCG CCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC AGTTATATCAAAGGATGGAGGTAATAAATACCAT GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCA GAGACAATTCCAAGAATGCGCTGTATCTGCAAAT GAATAGCCTGAGAGTTGAAGACACGGCTGTGTAT TACTGTGTGAGAAGAGGGCATCAGCTGGTCTG GATACTACTACTACAACGGTCTGGACGTCTGGGG CCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCT GCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG GTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCA GCGGCGTGCACACCTTCCAGCTGTCCTACAGTC CTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC GTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACA CCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTC GAGTGCCCACCGTGCCAGCACCACCTGTGGCAG GACCGTCAGTCTTCTTCTTCCCCCAAACCCAA GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC ACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGG AGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTTCAG CGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAAC GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA AAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT ACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAA GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC TTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCA CACCTCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA</p>

(continuación)

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
Secuencia de proteína de cadena pesada	<p><u>MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPG</u> RSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VISKDGGNKYHADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMN SLRVEDTAVYYCVRRGHQLVLGYYYNGLDVWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTV ERKCCVECPAPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTFRVVSVLTIVHVDWLNGLKEYKCKVS NKGLPAPIEKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
Secuencia de ADN de cadena ligera	<p><u>ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAA</u> <u>TGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGGATATTGT</u> GCTGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC CTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG TCAGAGCCTCTGTATAGTAATGGATACTTTT TGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCC ACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCCT CCGGGGTCCCTGACAGGTTGAGTGGCAGTGGATC AGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGATTG GAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGC AAGCTCTACAACTCCTCGGACGTTCCGGCCAAGG GACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGC ACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGC AGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCT GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA CAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC TCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT GTTAG</p>
Secuencia de proteína de cadena ligera	<p><u>MRLPAQLLGLLMLWVSGSSGDIVLTQSPLSLPVT</u> <u>PGEPASISCRSSQSLLYSNGYNFLDWYLQKPGQSPQLLI</u> YLGSNRASGVDRFSGSGSDFTLKISRLEAEDVG VYYCMQALQTPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEEKHK VYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC</p>

(continuación)

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
Dominio variable maduro de la secuencia de ADN de cadena pesada	<p>CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGTTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATATCAAAGGATGGAGGT AATAAATACCATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGAT TCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATGCGCT GTATCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGTTGAAGAC ACGGCTGTGTATTACTGTGTGAGAAGAGGGCATC AGCTGGTTCTGGGATACTACTACTACAACGGTCT GGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC TCCTCA</p>
Dominio variable maduro de la secuencia de proteína de cadena pesada	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVA VISKDGGNKYHADSVKGRFT ISRDNSKNALYLQMNSLRVEDTAVYYCVRRGHQL VLGYYYNGLDVWGQGTITVTVSS</p>
Dominio variable maduro de la secuencia de ADN de cadena ligera	<p>GATATTGTGCTGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCC CGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC AGGTCTAGTCAGAGCCTCTTGTATAGTAATGGAT ACAACTTTTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGG GCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTA ATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGG CAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC AGCAGATTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATT ACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCTCGGACGTT CGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA</p>
Dominio variable maduro de la secuencia de proteína de cadena ligera	<p>DIVLTQSPSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNFL DWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDFRFSGSGSGT DFTLKISRLEAEDVGVYYCMQALQTPRTFGQGTKV EIK</p>
ADN de cadena pesada (dominio variable) (3.1.1H-A78T) SEC ID N°: 89	<p>CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGTTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATATCAAAGGATGGAGGT AATAAATACCATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGAT TCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATCGCT GTATCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGTTGAAGAC ACGGCTGTGTATTACTGTGTGAGAAGAGGGCATC AGCTGGTTCTGGGATACTACTACTACAACGGTCT GGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC TCCTCA</p>
Proteína de cadena pesada (dominio variable) (3.1.1H-A78T) SEC ID N°: 90	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVA VISKDGGNKYHADSVKGRFT ISRDNSKNLYLQMNSLRVEDTAVYYCVRRGHQLV LGYYYYNGLDVWGQGTITVTVSS</p>

(continuación)

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
ADN de cadena pesada (dominio variable) (3.1.1H-A78T-V88A-V97A) SEC ID N°: 91	<p>CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATATCAAAGGATGGAGGT AATAAATACCATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGAT TCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATaCGCT GTATCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGcTGAAGAC ACGGCTGTGTATTACTGTGcGAGAAGAGGGGCATC AGCTGGTTCTGGGATACTACTACTACAACGGTCT GGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC TCCTCA</p>
Proteína de cadena pesada (dominio variable) (3.1.1H-A78T-V88A-V97A) SEC ID N°: 92	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVA VISKDGGNKYHADSVKGRFT ISRDNSKN7LYLQMNSLRaEDTAVYYCARRGHQLV LGYYYYNGLDVWGQGTTVTVSS</p>
ADN de cadena ligera (dominio variable) (3.1.1L-L4M-L83V) SEC ID N°: 93	<p>GATATTGTGaTGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCC CGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC AGGTCTAGTCAGAGCCTCTTGTATAGTAATGGAT ACAACTTTTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGG GCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTCTA ATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGG CAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC AGCAGAgTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATT ACTGCATGCAAGCTCTACAACTCCTCGGACGTT CGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA</p>
Proteína de cadena ligera (dominio variable) (3.1.1 L-L4M-L83V) SEC ID N°: 94	<p>DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNF LDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPRTFGQGTK VEIK</p>

Tabla 4: Secuencias de ADN y proteína del anticuerpo 7.1.2

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
Secuencia de ADN de cadena pesada	<p><u>ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGC</u> <u>TCTTTTAAGAGGGTGTCCAGTGTCAAGGTGCAGCTG</u> GTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGG AGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCG CCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC AGTTATATCAAATGATGGAGATAATAAATACCAT GCAGACTCCGTGTGGGGCCGATTCACCATCTCCA GAGACAATTCAGGAGCACGCTTTATCTGCAAAT GAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTATAT TACTGTGCGAGAAGAGGCATGGGGTCTAGTGGG AGCCGTGGGGATTACTACTACTACGGTTTGG ACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC CTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC CTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCA CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT CCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGG GCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTG TCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACC CAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCA GCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCA AATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCAGCACC ACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCC CAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGC CACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA AGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTC GTGTGGTCAGCGTCTCACCGTTGTGCACCAGGA CTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT CTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTCAAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACCTCCCATGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA TGA</p>

(continuación)

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
Secuencia de proteína de cadena pesada	<p><u>MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPG</u> <u>RSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA</u> <u>VISNDGDNKYHADSVWGRFTISRDNRSRSTLYLQMN</u> <u>SLRAEDTAVYYCARRGMGSSGSRGDYYYYYGLDV</u> <u>WGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL</u> <u>GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS</u> <u>GLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVD</u> <u>KTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLM</u> <u>ISRTPQVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA</u> <u>KTKPREEQFNSTFRVVSIVLTVVHQDWLNGKEYKC</u> <u>KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM</u> <u>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT</u> <u>TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVM</u> <u>HEALHNHYTQKSLSLSPGK</u></p>
Secuencia de ADN de cadena ligera	<p><u>ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAA</u> <u>TGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGGATATTGT</u> <u>GATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC</u> <u>CTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG</u> <u>TCAGAGCCTCTTGTATAGTAATGGATACAACTTTT</u> <u>TGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCC</u> <u>ACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCCT</u> <u>CCGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATC</u> <u>AGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTG</u> <u>GAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGC</u> <u>AAGCTCTACAACTCCTCGGACGTTCCGGCCAAGG</u> <u>GACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGC</u> <u>ACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGC</u> <u>AGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCT</u> <u>GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA</u> <u>CAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA</u> <u>ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA</u> <u>AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGAC</u> <u>GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT</u> <u>CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC</u> <u>TCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT</u> <u>GTTAG</u></p>
Secuencia de proteína de cadena ligera	<p><u>MRLPAOLLGLLMLWVSGSSGDIVMTQSPLSLPVT</u> <u>GEPASISCRSSQSLLYSNGYNFLDWYLQKPGQSPQL</u> <u>LIYLGSNRASGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDV</u> <u>GVYYCMQALQTPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP</u> <u>PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA</u> <u>LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKH</u> <u>KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u></p>

(continuación)

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
Dominio variable maduro de la secuencia de ADN de cadena pesada	<p>CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATATCAAATGATGGAGATA ATAAATACCATGCAGACTCCGTGTGGGGCCGATT CACCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAGCACGCTT TATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACA CGGCTGTATATTACTGTGCGAGAAGAGGCATGGG GTCTAGTGGGAGCCGTGGGGATTACTACTACTAC TACGGTTTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGG TCACCGTCTCCTCA</p>
Dominio variable maduro de la secuencia de proteína de cadena pesada	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVISNDGDNKYHADSVWGRF TISRDNRSRSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGMGS SGRGDYYYYYGLDVWGQGTITVTVSS</p>
Dominio variable maduro de la secuencia de ADN de cadena ligera	<p>GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCC CGTCAACCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC AGGTCTAGTCAGAGCCTCTTGTATAGTAATGGAT ACAACTTTTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGG GCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTA ATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGG CAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATT ACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCTCGGACGTT CGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA</p>
Dominio variable maduro de la secuencia de proteína de cadena ligera	<p>DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNF LDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGS TDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPRTFGQGTK VEIK</p>

Tabla 5: Secuencias de ADN y proteína del anticuerpo 10.8.3

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA (La secuencia señal se indica subrayada)
Secuencia de ADN de cadena pesada	<p><u>ATGAAACACCTGTGGTCTTCCTCCTGCTGGTGGC</u> <u>AGCTCCCAGATGGGTCTGTCCCAGGTGCAGCTG</u> CAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGG AGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGC TCCATCAGTAGTTACTACTGGATCTGGATCCGGC AGCCCGCCGGGAAGGGACTGGAATGGATTGGGC GTGTCTATACCAGTGGGAGCACCAACTACAACC CTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTCTAGTAGAC ACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCT CTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTG TCCGAGAGATGGTCTTTACAGGGGGTACGGTATG GACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCT CCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC CCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGC ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGG CGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCT GTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA GCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCAC CCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGC AAATGTTGTGTGCGAGTGCCACCGTGCCAGCAC CACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCC CCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGA CCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA AAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTT CGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTTGTGCACCAGG ACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGG TCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGA ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCC TGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA CTACAAGACCACCTCCCATGCTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT AAATGA</p>

(continuación)

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA (La secuencia señal se indica subrayada)
Secuencia de proteína de cadena pesada	<p><u>MKHLWFFLLLVAA</u>PRWVLSQVQLQESGPGLVKPS TSLTCTVSGGSISSYYWTWIRQPAGKGLEWIGRVY TSGSTNYPNPSLKSRTMSVDTSKNQFSLKLSVTA DTAVYYCARDGLYRGYGMDVWGQGTITVTVSSAS TKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECP PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD SHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK</p>
Secuencia de ADN de cadena ligera	<p><u>ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGC</u> <u>TGCTCTGGTTCCCAGGTTCCAGATGCGACATCCA</u> GATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTG TAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTGGGCGAG TCAGCCTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAG CAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAACTCCTGATTT ATTCTGCCTCCGGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATC AAGGTTCAAGCGGAGTGGATCTGGGACAGATTT ACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATT TTGCAACTACTATTGTCAACAGACTGACAGTTTC CCGCTCACTTTCGGCGGGCGGACCAAGGTGGAGA TCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCAT CTTCCCAGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGA TAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGT GTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC AGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG</p>
Secuencia de proteína de cadena ligera	<p><u>MRLPAOLLG</u>LLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVG DRVTITCRASQPISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYSAS GLQSGVPSRFRSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQ QTDSFPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSPVTKSFNRGEC</p>

(continuación)

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA (La secuencia señal se indica subrayada)
Dominio variable maduro de la secuencia de ADN de cadena pesada	<p>CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTG GTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCA CTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACTACTGG ATCTGGATCCGGCAGCCCGCCGGGAAGGGACTG GAATGGATTGGGCGTGTCTATAACCAGTGGGAGCA CCA ACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCAC CATGTCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCC CTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGG CCGTGTATTACTGTGCGAGAGATGGTCTTTACAG GGGGTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGAC CACGGTCACCGTCTCCTCA</p>
Dominio variable maduro de la secuencia de proteína de cadena pesada	<p>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWYWI RQPAGKGLEWIGRVYTSGSTNYNPSLKS RVTMSVD TSKNQFSLKLSVTAADTA VYYCARDGLYRGYGM DVWGQGTITVTVSS</p>
Dominio variable maduro de la secuencia de ADN de cadena ligera	<p>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGGCGAGTCAGCCTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAA CTCCTGATTTATTCTGCCTCCGGTTTGCAAAGTGG GGTCCCATCAAGGTT CAGCGGCAGTGGATCTGGG ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGC CTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGAC TGACAGTTTCCCGCTCACTTTCGGCGGGCGGGACC AAGGTGGAGATCAA</p>
Dominio variable maduro de la secuencia de proteína de cadena ligera	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQPISSWLAWY QQKPGKAPKLLIYSASGLQSGVPSRFSGSGS GTFDFT LTISSLQPEDFATYYCQQTDSFPLTFGGGTKVEIK</p>

Tabla 6: Secuencias de ADN y proteína del anticuerpo 15.1.1

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
Secuencia de ADN de cadena pesada	<p><u>ATGAAACATCTGTGGTCTTCCTTCTCCTGGTGGC</u> <u>AGCTCCAGATGGGTCCTGTCCAGGTGCAGCTG</u> CAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGG AGACCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGC TCCATCAGAAGTTACTACTGGACCTGGATCCGGC AGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGAT ATATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAATCC CTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGAC ATGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTT CTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTTTATTACTG TGCAGAAAGGGTGACTACGGTGGTAATTTAAC TACTTTCACCAGTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCA CCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGT CTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGGA ACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTT CCCAGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCC TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTT CGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTT GAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCACCGTGCC CAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGG ACGTGAGTCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGC ACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGC ACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAGGCCTCCCAGCCCCAT CGAGAAAACCATCTCAAACCAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAATAACAAGACCACACCTCCCATGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACAGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTAAATGA</p>

(continuación)

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
Secuencia de proteína de cadena pesada	<p><u>MKHLWFFLLVAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPS</u> TSLTCTVSGGSIRSYYWTWIRQPPGKLEWIGYTY YSGSTNYNPSLKSRTISVDMSKNQFSLKLSVTA DTAVYYCARKGDYGGNFNYFHQWGQGLVTVSS ASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFLL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK</p>
Secuencia de ADN de cadena ligera	<p><u>ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAA</u> <u>TGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGGATATTGT</u> GATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC CTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG TCAGAGCCTCTACATACTAATGGATACTACTAT TTCGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTC CACAACCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCC TCCGGGGTCCCTGACAGGTTGAGTGGCAGTGGAT CAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGT GGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATG CAAGCTCTACAACTCCGTACAGTTTTGGCCAGG GGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTG CACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAG CAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCT GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA CAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC TCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT GTTAG</p>
Secuencia de proteína de cadena ligera	<p><u>MRLPAQLLGLLMLWVSGSSGDIVMTQSPLSLPVT</u> PGEASISCRSSQSLHTNGYNYFDWYLQKPGQSPQL LIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCMQALQTPYSFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>

(continuación)

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
Dominio variable maduro de la secuencia de ADN de cadena pesada	<p>CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTG GTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCA CTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGAAGTTACTACTG GACCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACT GGAGTGGATTGGATATATCTATTACAGTGGGAGC ACCAACTACAATCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCA CCATATCAGTAGACATGTCCAAGAACCAGTTCTC CCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCTGCGGACACG GCCGTTTATTACTGTGCGAGAAAGGGTGACTACG GTGGTAATTTTAACTACTTTCACCCAGTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA</p>
Dominio variable maduro de la secuencia de proteína de cadena pesada	<p>QVQLQESGPNLVKPSSETLSLTCTVSGGSIRSYWYTW IRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYPNPSLKSRTISVD MSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARKGDYGGNFN YFHQWGQGLTVTVSS</p>
Dominio variable maduro de la secuencia de ADN de cadena ligera	<p>GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCC CGTACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC AGGTCTAGTCAGAGCCTCCTACATACTAATGGAT ACAAC TATTTTCGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGG GCAGTCTCCAACTCCTGATCTATTTGGGTTCTA ATCGGGCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGG CAGTGGATCAGGCACAGATTTTACTGAAAATC AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATT ACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCGTACAGTTT TGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA</p>
Dominio variable maduro de la secuencia de proteína de cadena ligera	<p>DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHTNGYNY FDWYLQKPGQSPQLLIYLGSRASGVNDRFSGSGS TDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPYSFGQGTK LEIK</p>

Tabla 7: Secuencias de ADN y proteína del anticuerpo 21.4.1

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
Secuencia de ADN de cadena pesada	<p><u>ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGG</u> <u>CAGCAGCCACAGGAGCCACTCCCAGGTGCAGCT</u> GGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGG GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGA TACACCTTCACCGGCTACTATATGCACTGGGTGC GACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGG GATGGATCAACCCTGACAGTGGTGGCACAACTA TGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACC AGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGC TGAACAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTA TACTGTGCGAGAGATCAGCCCCTAGGATATTGT ACTAATGGTGTATGCTCCTACTTTGACTACTGGG GCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTC CACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCC TGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCC TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC GGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCTCTGACC AGCGGCGTGCACACCTTCCAGCTGTCTACAGT CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC CGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTAC ACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGT CGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACCTGTGGCA GGACCGTCAAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCA AGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGG GAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCA GCGTCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAA CGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCA AGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGG CTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACC ACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA</p>

(continuación)

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
Secuencia de proteína de cadena pesada	<p><u>MDWTWRILFLVAAATGAHSQVQLVQSGAEVKKPG</u> ASVKVSCKASGYTFTGYMHVWRQAPGGLEWM GWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMEL NRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTV ERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
Secuencia de ADN de cadena ligera	<p><u>ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGC</u> <u>TGCTCTGGTCCCAGGTTCCAGATGCGACATCCA</u> GATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTG TAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTGGGCGAG TCAGGGTATTTACAGCTGGTTAGCCTGGTATCAG CAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAACCTCCTGATCT AACTGCATCCACTTTACAAAGTGGGGTCCCATC AAGGTTACGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTT ACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAACCTGAAGATT TTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCTAACATTTTC CCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGA TCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCAT CTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGA TAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGT GTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC AGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG</p>
Secuencia de proteína de cadena ligera	<p><u>MRLPAQLLGLLLWFPGSRCDIQMTQSPSSVSASVG</u> DRVTITCRASQGIYSWLA WYQQKPGKAPNLLIYTA STLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTLSLQPEDFATYYC QQANIFPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>

(continuación)

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
Dominio variable maduro de la secuencia de ADN de cadena pesada	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCTACTATATG CACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTG AGTGGATGGGATGGATCAACCCTGACAGTGGTGG CACAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTC ACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCT ACATGGAGCTGAACAGGCTGAGATCTGACGACA CGGCCGTGTACTACTGTGCGAGAGATCAGCCCCT AGGATATTGTAATAATGGTGTATGCTCCTACTTTG ACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTC CTCA
Dominio variable maduro de la secuencia de proteína de cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYM HWVRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGR VTMTRDTSISTA YMELNRLRSDDTAVYYCARDQPL GYCTNGVCSYFDYWGQGLVTVSS
Dominio variable maduro de la secuencia de ADN de cadena ligera	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTTACAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAC CTCCTGATCTATACTGCATCCACTTTACAAAGTGG GGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGG ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAAC CTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGC TAACATTTTCCCGCTCACTTTCCGGCGGAGGGACC AAGGTGGAGATCAAA
Dominio variable maduro de la secuencia de proteína de cadena ligera	DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQGIYSWLAWY QQKPGKAPNLLIYTA STLQSGVPSRFSGSGSDFT LTISSLQPEDFATYYCQQANIFPLTFGGGTKVEIK

Tabla 8: Secuencias de ADN y proteína de los dominios variables maduros del anticuerpo 21.2.1

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA:
ADN de cadena pesada	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGTCATG CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGG AGTGGGTGGCAGTTATGTCATATGATGGAAGTAG TAAATACTATGCAAACCTCCGTGAAGGGCCGATT ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGT ATCTGCAAATAAACAGCCTGAGAGCTGAGGACA CGGCTGTGTACTACTGTGCGAGAGATGGGGGTAA AGCAGTGCCTGGTCTGACTACTGGGGCCAGGGA ATCCTGGTCACCGTCTCCTCAG

(continuación)

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA:
Proteína de cadena pesada	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYVMH WVRQAPGKGLEWVA VMSYDGSSKYYANSVKGRF TISRDN SKNTLYLQINSLRAEDTAVYYCARDGGKA VPGPDYWGQILVTVSS
ADN de cadena ligera	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCC CGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC AGGTCTAGTCAGAGTGTTCTGTATAGTAATGGAT ACA ACTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGG GCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTA ATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGG CAGTGGATCAGGCACAGATTTTACTGAAAATC AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATT ACTGCATGCAAGTTTTACAACTCCATTCACCTTC GGCCCTGGGACCAAGTGGATATCAAAC
Proteína de cadena ligera	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSVLYSNGYNY LDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGV PDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQVLQTPFTFGPGTK VDIK

Tabla 9: Secuencias de ADN y proteína de los dominios variables maduros del anticuerpo 22.1.1

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA:
ADN de cadena pesada	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTCGCTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATATCATCTGATGGAGGTA ATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATT CACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG TATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACA CGGCTGTGTACTACTGTACGAGAAGAGGGACTGG AAAGACTTACTACCACTACTGTGGTATGGACGTC TGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAG
Proteína de cadena pesada	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRYGMH WVRQAPGKGLEWVA VISSDGGNKYYADSVKGRFT ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRGTGKT YYHYCGMDVWGQGTTVTVSS

(continuación)

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA:
ADN de cadena ligera	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCC CGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC AGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGTATAGTAATGGAT ATAACTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGG GCAGTCTCCACACCTCCTGATCTATTTGGGTTCTA ATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTGAGTGG CAGTGGTTCAGGCACTGATTTTACACTGAAAATC AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATT ACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCTCGGACGTT CGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAC
Proteína de cadena ligera	DIVMTQSPLSLPVTPEPAPISCRSSQSLLYSNGYNY LDWYLQKPGQSPHLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPRTFGQGTK VEIK

Tabla 10: Secuencias de ADN y proteína de los dominios variables maduros del anticuerpo 23.5.1

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA:
ADN de cadena pesada	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG TAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCAATTATATCATATGATGGAAGTA ATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATT CACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG TATGTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGAC ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACGCGGTCACT ACGGGAGGGATTACTACTCCTACTACGGTTTGGGA CGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCC TCAG
Proteína de cadena pesada	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSNYGMH WVRQAPGKGLEWVAIISYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYVQMNSLRAEDTAVYYCARRGHYGR DYYSYYGLDVWGQGTTVTVSS
ADN de cadena ligera	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCC CGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC AGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCCTGGTAATGGAT ACAACTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGG GCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTA ATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTGAGTGG CAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATT ACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCTCGGACGTT CGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAC

(continuación)

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA:
Proteína de cadena ligera	DIVMTQSPLSLPVTGEPASISCRSSQSLLPNGYNY LDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDRFSGSGS TDFTLKISRVEADVGVYYCMQALQTPRTFGQGTK VEIK

Tabla 11: Secuencias de ADN y proteína de los dominios variables maduros del anticuerpo 23.28.1

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA:
ADN de cadena pesada	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTG GTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCACCTGCA CTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGAGGTTACTACTG GAGCTGGATCCGGCAGCCCCCTGGGAAGGGACT GGAGTGGATTGGGTATATCTATTACAGTGGGAGC ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCA CCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTC CCTGAAGCTGAACTCTGTGACCGCTGCGGACACG GCCGTGTATTATTGTGCGAGAAAGGGGGGCCTCT ACGGTGACTACGGCTGGTTCGCCCCCTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
Proteína de cadena pesada	QVQLQESGPGLVKPSDLSLTCTVSGGSIRGYYS WIRQPPGKLEWIGYIYSGSTNYPNLSKSRVTISV DTSKNQFSLKLNVTAAADVYYCARKGGLYGDY GWFAPWGQGLVTVSS
ADN de cadena ligera	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGT CTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG CAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCGACTTA GCCTGGCACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA GACTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCAC TGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCT GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGG AGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCA CTGTCGTAGCTTATTCATTTTCGGCCCTGGGACCA AAGTGGATATCAAAC
Proteína de cadena ligera	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSDLAWH QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHCRLFTFGPGTKVDIK
ADN de cadena pesada (dominio variable) (23.28.1H-D16E) (SEC ID N°: 97)	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTG GTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCA CTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGAGGTTACTACTG GAGCTGGATCCGGCAGCCCCCTGGGAAGGGACT GGAGTGGATTGGGTATATCTATTACAGTGGGAGC ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCA CCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTC CCTGAAGCTGAACTCTGTGACCGCTGCGGACACG GCCGTGTATTATTGTGCGAGAAAGGGGGGCCTCT ACGGTGACTACGGCTGGTTCGCCCCCTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG

(continuación)

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA:
Proteína de cadena pesada (dominio variable) (23.28.1H-D16E) (SEC ID N°: 98)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIRGYYS WIRQPPGKGLEWIGYTYYSGSTNYPNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLNSTVAADTAVYYCARKGGGLYGDY GWFAPWGQGLVTVSS

Tabla 12: Secuencias de ADN y proteína de los dominios variables maduros del anticuerpo 23.29.1

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA:
ADN de cadena pesada	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTA ATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATT CACCATCTACAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG TATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACA CGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACGCGGTCACTA CGGGAATAATTACTACTCCTATTACGGTTTGGAC GTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCT CAG
Proteína de cadena pesada	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMH WVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFT IYRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGHY NNYYSYYGLDVWGQGTITVTVSS
ADN de cadena ligera	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCC CGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC AGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCCTGGTAATGGAT ACAAC TATTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGG GCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTA ATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGG CAGTGGCTCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGATTTATT ACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCTCGGACGTT CGGCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAC
Proteína de cadena ligera	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLPNGYNY LDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGS TDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQALQTPRTFGQGTK VEIK

Tabla 13: Secuencias de ADN y proteína de los dominios variables maduros del anticuerpo 24.2.1

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA
ADN de cadena pesada	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTG GTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCTCACCTGCA CTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGAGGTTACTACTG GAGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACT GGAGTGGATTGGGTATATCTATTACAGTGGGAGC ACCAACTACAACCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCA CCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTC CCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCTGCGGACACG GCCGTGTATTACTGTGCGAGAAGGGGGGGCCTCT ACGGTGACTACGGCTGGTTCGCCCCCTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
Proteína de cadena pesada	QVQLQESGPNLVKPSSETLSLTCTVSGGSIRGYYWS WIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARRGGLYGDY GWFAPWGQGLVTVSS
ADN de cadena ligera	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGT CTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG CAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCACCTACTTA GCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA GGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCAC TGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCT GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGG AGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCA GTATAGTAGCTTATCACTTTCGGCCCTGGGACC AAAGTGGATATCAAAC
Proteína de cadena ligera	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSSTYLAWY QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQYSSLFTFGPGTKVDIK

Tabla 14: Secuencias de ADN y proteína del anticuerpo 21.2.1

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
ADN de cadena pesada	<p><u>ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCTCGTTGC</u> <u>TCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGTCCAGGTGCAGCTG</u> GTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGG AGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTCAGTAGCTATGTCATGCACTGGGTCCG CCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC AGTTATGTCATATGATGGAAGTAGTAAATACTAT GCAAACCTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCA GAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAT AAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTAT TACTGTGCGAGAGATGGGGGTAAAGCAGTGCCTG GTCCTGACTACTGGGGCCAGGGAATCCTGGTCAC CGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTC TTCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCG AGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAA CTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC CCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCT CAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTC GGCACCCAGACCTACACCTGCAACGATAGATCACA AGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTG AGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCACCGTGCCC AGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTC TTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGAA CGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCA CGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCAC CAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCG GGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGAC CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACT CCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC GGGTAAATGA</p>

(continuación)

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
Proteína de cadena pesada	<p><u>MEFGLSWVFLVALLRGVOCQVQLVESGGGVVQPG</u> <u>RSLRLSCAASGFTFSSYVMHWVRQAPGKGLEWVA</u> <u>VMSYDGSSKYYANSVKGRFTISRDN SKNTLYLQINS</u> <u>LRAEDTAVYYCARDGGKAVPGPDYWGQGLVTVS</u> <u>SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP</u> <u>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP</u> <u>SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV ERKCCVECP</u> <u>PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD</u> <u>VS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF</u> <u>RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK</u> <u>TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK</u> <u>GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFL</u> <u>YSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKS</u> <u>LSLSPGK</u></p>
ADN de cadena ligera	<p><u>ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAA</u> <u>TGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGGATATTGT</u> <u>GATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC</u> <u>CTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG</u> <u>TCAGAGTGTCTGTATAGTAATGGATACTAAT</u> <u>TTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTC</u> <u>CACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCC</u> <u>TCCGGGGTCCCTGACAGGTT CAGTGGCAGTGGAT</u> <u>CAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGT</u> <u>GGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATG</u> <u>CAAGTTTTACAACTCCATTCATTTCCGGCCCTGG</u> <u>GACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCA</u> <u>CCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA</u> <u>GTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGC</u> <u>TGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA</u> <u>GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAC</u> <u>TCCAGGAGAGTGT CACAGAGCAGGACAGCAAG</u> <u>GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGC</u> <u>TGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCT</u> <u>ACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC</u> <u>GCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG</u> <u>TTAG</u></p>
Proteína de cadena ligera	<p><u>MRLPAOLLGLLMLWVSGSSGDIVMTQSPLSLPVT</u> <u>GEPASISCRSSQSVLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQL</u> <u>LIYLGSNRASGV PDRFSGSGGTDFTLKISRVEADV</u> <u>GVYYCMQVLQTPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFP</u> <u>PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA</u> <u>LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKH</u> <u>KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u></p>

Tabla 15: Secuencias de ADN y proteína del anticuerpo 22.1.1

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
ADN de cadena pesada	<p><u>ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGC</u> <u>TCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGT</u>CAGGTGCAACTG GTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGG AGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTCAGTCGCTATGGCATGCACTGGGTCCG CCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC AGTTATATCATCTGATGGAGGTAATAAATACTAT GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCA GAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAT GAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTAT TACTGTACGAGAAGAGGGACTGGAAAGACTTACT ACCACTACTGTGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGG GACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAG GGCCATCGGTCTTCCCCTGGCGCCCTGCTCCA GGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAG GACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC CTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGC AACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG GACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGCGAGT GCCACCGTGCCCAGCACCACTGTGGCAGGACC GTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGT GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCG AGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGA GCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTC CTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCC TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAAC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT ACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACAC CTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA</p>

(continuación)

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
Proteína de cadena pesada	<p><u>MEFGLSWVFLVALLRGVOCQVQLVESGGGVVQPG</u> RSLRLSCAASGFTFSRYGMHWVRQAPGKGLEWVA VISSDGGNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRRGTGKTYHYHCGMDVWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVK CCVECPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYCKVSNKG LPAPIEKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK</p>
ADN de cadena ligera	<p><u>ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAA</u> <u>TGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGGATATTGT</u> GATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC CTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG TCAGAGCCTCCTGTATAGTAATGGATATAACTAT TTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTC CACACCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCC TCCGGGGTCCCTGACAGGTTGAGTGGCAGTGGTT CAGGCACTGATTTACACTGAAAATCAGCAGAGT GGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATG CAAGCTCTACAACTCCTCGGACGTTGGCCAAG GGACCAAGGTGAAATCAAACGAACTGTGGCTG CACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAG CAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCT GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA CAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC TCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT GTTAG</p>
Proteína de cadena ligera	<p><u>MRLPAQLLGLLMLWVSGSSGDIVMTQSPLSLPVTP</u> GEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPHL LIYLGSNRASGVDRFSGSGSDFTLTKISRVEAEDV GVYYCMQALQTPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLKADYEK KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>

Tabla 16: Secuencias de ADN y proteína del anticuerpo 23.5.1

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
ADN de cadena pesada	<p><u>ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGC</u> <u>TCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGTCCAGGTGCAGCTG</u> GTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGG AGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATT CACCTTCAGTAACTATGGCATGCACTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCA ATTATATCATATGATGGAAGTAATAAACTATG CAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATGTGCAAATG AACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATT ACTGTGCGAGACGCGGTCACTACGGGAGGGATTA CTACTCCTACTACGGTTTGGACGTCTGGGGCCAA GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCA AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTC CAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACC GG ACGGTGTGCGTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCG GCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTC AGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG CCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCT GCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGA GTGCCACCGTGCCCAGCACCACCTGTGGCAGGA CCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGG ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC GTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCC GAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGG AGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGC CTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACA CCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC TACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACA CCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCT CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA</p>

(continuación)

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
Proteína de cadena pesada	<p><u>MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPG</u> RSLRLSCVASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVA IISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYVQMNS LRAEDTAVYYCARRGHYGRDYYSYGLDVWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERK CCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTIVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL LPAPIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSPGK</p>
ADN de cadena ligera	<p><u>ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAA</u> TGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGGATATTGT GATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC CTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG TCAGAGCCTCCTGCCTGGTAATGGATACTAAT TTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTC CACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCC TCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGAT CAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGT GGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATG CAAGCTCTACAACTCCTCGGACGTTTCGGCCAAG GGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTG CACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAG CAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTSTGTTGTGTGCCT GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA CAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCYTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC TCGCCCCTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT GTAA</p>
Proteína de cadena ligera	<p><u>MRLPAQLLGLLMLWVSGSSGDIVMTQSPLSLPVT</u> GEPASISCRSSQSLLPGNGYNYLDWYLQKPGQSPQL LIYLGSNRASGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEADV GVYYCMQALQTPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTAXVVCLLNFPYFVPEAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHK KQYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>

Tabla 17: Secuencias de ADN y proteína del anticuerpo 23.28.1

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
ADN de cadena pesada	<p><u>ATGAAACATCTGTGGTTCTTCCTTCTCCTGGTGGC</u> <u>AGCTCCCAGATGGGTCCGTCCAGGTGCAGCTG</u> CAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGG AGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGC TCCATCAGAGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGC AGCCCCCTGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGT ATATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAACC CTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGAC ACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAAGT CTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTATTG TGCGAGAAAGGGGGCCTCTACGGTGACTACGG CTGGTTCGCCCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC ACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG TCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGA ACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTT CCCAGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCC TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTT CGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTT GAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCC CAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGC ACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGC ACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAGGCCTCCCAGCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACA ACTACAAGACCACACCTCCATGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTAAATGA</p>

(continuación)

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
Proteína de cadena pesada	<p><u>MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSE</u> TSLTCTVSGGSIRGYYSWIRQPPGKLEWIGYTY YSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLNVTAA DTA VYYCARKGGLYGDYGFAPWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK</p>
ADN de cadena ligera	<p><u>ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCT</u> <u>ACTCTGGCTCCCAGAATCCACCGGAGAAATTGTG</u> TTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCC AGGGGAAAGAGCCACCCTCCTGCAGGGCCAGT CAGAGTGTTAGCAGCAGCGACTTAGCCTGGCACC AGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGACTCCTCAT CTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA GACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACT TCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGA TTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCACTGTCGTAGCT TATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATC TTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGAT AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTG TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAG ACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGT CACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG AGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG</p>
Proteína de cadena ligera	<p><u>METPAQLLFLLLLWLPESTGEIVLTQSPGTLSPG</u> RATLSCRASQSVSSDLAWHQKPGQAPRLLIYGA SSRATGIPDRFSGSGSDFTLTISRLEPEDFAVYYC QHCRSLFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPRKAVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>

Tabla 18: Secuencias de ADN y proteína del anticuerpo 23.29.1

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
ADN de cadena pesada	<p><u>ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGC</u> <u>TCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGT</u>CAGGTGCAACTG GTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGG AGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTCAGTAGCTATGCCATGCACTGGGTCCG CCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC AGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTAT GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTACA GAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAT GAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTAT TACTGTGCGAGACGCGGTCACTACGGGAATAATT ACTACTCCTATTACGGTTTGGACGTCTGGGGCCA AGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACC AAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCT CCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGG GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT GACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGC GGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT GCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC TGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCTG AGTGCCACCGTGCCAGCACCACTGTGGCAGG ACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA CGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC CGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAG GAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCG TCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGG CCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA ACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC ACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGA ACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT CTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACA CCTCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCT CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA</p>

(continuación)

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
Proteína de cadena pesada	<p><u>MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPG</u> RSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVA VISYDGSNKYYADSVKGRFTIYRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARRGHYGNYYSYGLDVWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVR KCCVECPPEPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPAPIEKTKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPM LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK</p>
ADN de cadena ligera	<p><u>ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAA</u> <u>TGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGGATATTGT</u> GATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC CTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG TCAGAGCCTCCTGCCTGGTAATGGATACTACTAT TTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTC CACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCC TCCGGGGTCCCTGACAGGTTGAGTGGCAGTGGCT CAGGCACAGATTTTACTGAAAATCAGCAGAGT GGAGGCTGAGGATGTTGGGATTTATTACTGCATG CAAGCTCTACAACTCCTCGGACGTTTCGGCCAAG GGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTG CACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAG CAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCT GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGT CAGTGGAGGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC TCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT GTTAG</p>
Proteína de cadena ligera	<p><u>MRLPAQLLGLLMLWVSGSSGDIVMTQSPLSLPVTP</u> GEPASISCRSSQSLLPNGNYLDWYLQKPGQSPQL LIYLGSNRASGVPRDFSGSGSDFTLTKISRVEAEDV GIYYCMQALQTPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWRVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>

(continuación)

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
ADN de cadena ligera (23.29.1LR174K) (SEC ID N°: 101)	<p><u>ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAA</u> <u>TGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGGATATTGT</u> GATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC CTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG TCAGAGCCTCCTGCCTGGTAATGGATACTAAT TTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTC CACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCC TCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAAGTGGCAGTGGCT CAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGT GGAGGCTGAGGATGTTGGGATTTATTACTGCATG CAAGCTCTACAACTCCTCGGACGTTTCGGCCAAG GGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTG CACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAG CAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCT GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGT CAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC TCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT GTTAG</p>
Proteína de cadena ligera (23.29.1LR174K) (SEC ID N°: 101)	<p><u>MRLPAQLLGLLMLWVSGSSGDIVMTQSPLSLPVT</u> <u>GEPAISCRSSQSLLPGNGYNYLDWYLQKPGQSPQL</u> LIYLGSNRASGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADV GIYYCMQALQTPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>

Tabla 19 : Secuencias de ADN y proteína del anticuerpo 24.2.1

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
--------------	---

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
ADN de cadena pesada	<p><u>ATGAAACATCTGTGGTTCCTTCCTTCCTGGTGGC</u> <u>AGCTCCCAGATGGGTCCCTGTCCAGGTGCAGCTG</u> CAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGG AGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGC TCCATCAGAGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGC AGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGT ATATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAACCC CTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGAC ACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTT CTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAGAAGGGGGGGCCTCTACGGTGACTACGG CTGGTTCGCCCCCTGGGGCCAGGGAACCTGGTC ACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG TCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGA ACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTT CCCAGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCC TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTT CGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTT GAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCACCGTGCC CAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGC ACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGC ACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAATAACAAGACCACACCTCCCATGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTAAATGA</p>

(continuación)

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
Proteína de cadena pesada	<p><u>MKHLWFFLLVAAPRWVLSQVQLQESGPGLVK</u>PSE TLSLTCTVSGGSIRGYYSWIRQPPGKLEWIGYTY YSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSTAA DTAVYYCARRGGLYGDYGFAPWGQGLVTVSS ASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTKCVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREEVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSSFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK</p>
ADN de cadena ligera	<p><u>ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTCCTCCTGCT</u> <u>ACTCTGGTCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTG</u> TTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCC AGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGT CAGAGTGTTAGCAGCACCTACTTAGCCTGGTACC AGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCAT CTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA GACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACT TCACTCTACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGA TTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATAGTAGCT TATCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATC TTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGAT AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTG TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAG ACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGT CACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG AGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG</p>
Proteína de cadena ligera	<p><u>METPAQLLELLLWLPD</u>TTEIVLTQSPGTLSLSPGE RATLSCRASQSVSSTYLAWYQQKPGQAPRLLIYGA SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYSSLFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>

Tabla 20: Secuencias de ADN y proteína de los dominios variables maduros del anticuerpo 22.1.1H-C109A

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
ADN de cadena pesada (SEC ID N°: 95)	CAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTCGCTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATATCATCTGATGGAGGTA ATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATT CACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG TATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACA CGGCTGTGTACTACTGTACGAGAAGAGGGACTGG AAAGACTTACTACCACTACGCCGGTATGGACGTC TGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAG
Proteína de cadena pesada (SEC ID N°: 96)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRYGMH WVRQAPGKGLEWVA VISSDGGNKYYADSVKGRFT ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRGTGKT YYHYAGMDVWGQGTTVTVSS

Tabla 21: Secuencias de ADN y proteína de los dominios variables maduros del anticuerpo 23.28.1L-C92A

DESCRIPCIÓN:	SECUENCIA: (La secuencia señal se indica subrayada)
ADN de cadena ligera (SEC ID N°: 99)	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGT CTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG CAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCGACTTA GCCTGGCACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA GACTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCAC TGGCATCCAGACAGGTT CAGTGGCAGTGGGTCT GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGG AGCCTGAAGATTTTGCAGTGTACTACTGTCAGCA CGCCCGTAGCTTATTCACCTTTCGGCCCTGGGACC AAAGTGGATATCAAAC
Proteína de cadena ligera (SEC ID N°: 100)	EIVLTQSPGTLSLSLSPGERATLSCRASQSVSSDLAWH QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQHARSLFTFGPGTKVDIK

Ejemplo III

Análisis de sustituciones de aminoácidos de cadena pesada y ligera

- 5 Las Figuras 1D-1H y 2D-2H proporcionan alineamientos de secuencia entre las secuencias previstas de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada de los anticuerpos monoclonales 3.1.1, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1. 1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.29.1 y 24.2.1 y las secuencias de aminoácidos de la línea germinal de sus respectivos genes. La mayoría de las regiones CDR3 de cadena pesada contienen inserciones de aminoácidos.
- 10 El gen DLR1 utilizado en el dominio V_H del anticuerpo 21.4.1 codifica dos restos de cisteína (Cys). El análisis de espectrometría de masas y modelado por homología demostró que los dos restos de Cys estaban unidos por puentes disulfuro, y que estos puentes disulfuro no alteraban la estructura del anticuerpo.
- 15 Las Figuras 1A-1C y 2A-2C proporcionan alineamientos de secuencia entre las secuencias previstas de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera de los anticuerpos monoclonales 3.1.1, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.28.1, 23.28.1L-C92A, 23.29.1 y clones 24.2.1 y las secuencias de aminoácidos de la línea germinal de sus respectivos genes. Las cadenas ligeras de estos anticuerpos derivan de tres genes V_K diferentes. Siete de los once anticuerpos utilizan el gen A3/A19 V_K, seis de los cuales tienen dos mutaciones en la región CDR1. Además, cinco de los siete anticuerpos que utilizan el gen A3/A19 V_K, también utilizan el gen J_K 1; en todos estos anticuerpos el primer aminoácido derivado del gen J_K1 está cambiado regularmente de una W a una R.
- 20 Se apreciará que muchas de las sustituciones o inserciones de aminoácidos identificadas anteriormente se encuentran muy cerca de o dentro de una CDR. Dichas sustituciones parecerían producir algún efecto sobre la unión

del anticuerpo con la molécula CD40. Además, dichas sustituciones podrían tener un efecto significativo sobre la afinidad de los anticuerpos.

Ejemplo IV

Reactividad cruzada de especies de los anticuerpos de la invención

- 5 Se realizó análisis FACS para determinar la unión y afinidad de los anticuerpos de la invención por CD40 de diversas especies, particularmente determinados monos del viejo mundo. Se incubaron partes alícuotas de sangre entera de ser humano y mono durante 1 hora en hielo con concentraciones en aumento de anticuerpos anti-CD40 de la invención ilustrados en el presente documento o con un anticuerpo anti-hemocianina de lapa californiana (HLC) como control negativo. Después, las muestras se incubaron durante 30 minutos en hielo con anti-IgG2 humana conjugada con RPE (ficoeritrina). Se midió la unión por citometría de flujo de linfocitos B CD 19/CD20 positivos y se analizaron los histogramas de intensidad de fluorescencia (F12-H) frente al número de células (recuentos) utilizando el programa informático CellQuest. Se calculó la unión (K_D) de cada anticuerpo a partir de los gráficos de intensidad de fluorescencia media frente a la concentración de anticuerpo. Se controló el empobrecimiento de los anticuerpos midiendo la unión sobre un intervalo de concentraciones celulares.
- 10
- 15 Los anticuerpos 3.1.1, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1 y 21.4.1 se sometieron a ensayo con respecto a la unión a linfocitos B de ser humano, monos rhesus y cinomolgos. También se ensayaron los anticuerpos 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.29.1 y 24.2.1 con respecto a la unión a linfocitos B de ser humano y mono cinomolgo.

Se observó que la señal máxima y la concentración para la mitad de la unión máxima con células de mono se encontraban dentro de un factor de dos con respecto a los parámetros correspondientes para linfocitos B humanos. No se observó unión en experimentos similares con sangre de ratón, rata, conejo y perro.

20

Ejemplo V

Selectividad de anticuerpos por CD40

Se realizó otro ensayo *in vitro* para determinar la selectividad de anticuerpos en la invención con respecto a CD40.

Selectividad de CD40 por ELISA: Materiales y Procedimientos

- 25 Una placa FluroNUNC de 96 pocillos (Catálogo Nunc N° 475515) se revistió con cuatro antígenos: CD40/Ig, CD44/Ig, RANK/Ig, 4-1BB/Ig, TNFR-1/Ig y TNFR-2/Ig (antígenos generados internamente), durante una noche a +4 °C a 1 µg/ml de 100 µl/pocillo en tampón de bicarbonato sódico 0,1 M, pH 9,6. Después, la placa se lavó con PBST (PBS + Tween-20 al 0,1 %) tres veces y se bloqueó la placa con PBST+ BSA al 0,5 % a 150 µl/pocillo. Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora y después se lavó tres veces con PBST. A continuación, los anticuerpos anti-CD40 generados en el Ejemplo I se diluyeron en bloque a 1 µg/ml y se añadieron los anticuerpos diluidos a la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y después se lavó tres veces con PBST. Después, los pocillos que contenían los anticuerpos generados en el Ejemplo I se trataron con 100 µl/pocillo de anti-IgG2 humana conjugada con HRP (Southern Biotech Cat N° 9070-05) a una dilución de 1:4.000 en bloque. También se trató una fila con anti-IgG humana (Jackson Cat N° 209-035-088) diluido a 1:5.000 en bloque y se añadió a 100 µl/pocillo para normalizar el revestimiento de la placa. También se trató una fila con anti-CD40 humano conjugado con HRP (Pharmingen Cat N° 345815/ conjugado con HRP habitual) a 0,05 µl/ml diluido en bloque como control positivo. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y después se lavó tres veces con PBST. Se añadió sustrato TMB (K & P Labs) a 100 µl/pocillo y la placa se incubó durante 5 a 10 minutos. Después la placa se leyó utilizando un lector de placa Spectra-Max™. Los resultados demuestran que los anticuerpos tienen una selectividad por CD40 que es al menos 100 veces mayor que su selectividad por RANK, 4-1BB, TNFR-1 y TNFR-2 ya que la señal específica de CD4 (señal CD40 menos el fondo) es al menos 100X mayor que la señal correspondiente para el resto de moléculas.
- 30
- 35
- 40

Ejemplo VI

Estudios de clasificación de epítopes

- 45 Habiendo demostrado que los anticuerpos de la invención son selectivos por CD40 se realizó un análisis de unión competitivo utilizando BIAcore y FACS.

Estudios BIAcore competitivos

Para determinar si los anticuerpos anti-CD40 humanos de la invención se unían a los mismos sitios o a distintos sitios sobre la molécula CD40 se realizaron estudios BIAcore competitivos

50

5 En estos experimentos se usó un instrumento BIAcore 2000 siguiendo los protocolos del fabricante. La proteína A se inmovilizó sobre la superficie de la microplaca detectora del BIAcore. Una concentración saturante de CD40-Ig, que comprendía el dominio extracelular de CD40, se unió a la microplaca detectora. Después, un primer anticuerpo anti-CD40 agonista humano de la invención, un anticuerpo anti-CD40 comercial o CD40L se unió con el CD40 unido a la microplaca detectora en condiciones saturantes. Después se midió la capacidad de un segundo anticuerpo anti-CD40 agonista humano de la invención para competir con el primer anticuerpo, el anticuerpo comercial o CD40L para la unión a CD40. Esta técnica permite asignar los anticuerpos a diferentes grupos de unión. La unión a CD40 indica reconocimiento de un epítipo independiente. La ausencia de unión puede indicar reconocimiento del mismo epítipo o de epítopes solapantes.

10 *Estudios FACS*

15 Para determinar si los anticuerpos anti-CD40 humanos de la invención se unían a los mismos sitios o a distintos sitios sobre la molécula CD40 se realizaron estudios FACS y para determinar si se unían al mismo sitio o a sitios distintos sobre la molécula CD40 como los anticuerpos anti-CD40 de venta en el mercado EA5 (Alexis N° de catálogo ANC-300-050), LOB7/6 (Serotec MCA/590PE) y 5C3 (Pharmingen N° 555458 (no marcado) y 555460 (marcado con PE para FACS).

20 Células dendríticas, teñidas con tinción de contraste, se trataron con anticuerpos anti-CD40 de la invención con el anticuerpo EA5 marcado con PE o con LOB7/6 marcado con PE en hielo durante 30 minutos. Después de un lavado, la tinción celular se analizó sobre un citómetro de calibre B-D. La unión reducida de los anticuerpos comerciales se interpretó como una señal de que el anticuerpo de ensayo se unía al mismo epítipo o a epítopes solapantes.

Los análisis de unión competitiva por BIAcore y FACS demostraron que los epítopes reconocidos por los anticuerpos mAb 21.4.1 se solapaban con el epítipo reconocido por el anticuerpo EA5, no se solapaban con el epítipo reconocido por el anticuerpo LOB7/6 de venta en el mercado y no solapan con el sitio de unión para CD40L. Los epítopes reconocidos por los anticuerpos restantes se solapan con el sitio de unión para CD40L.

25 La Tabla 22 resume los resultados de estos estudios de clasificación de epítopes.

TABLA 22

Clasificación de epítopes por BIAcore competitivo de <u>determinados anticuerpos anti-CD40 de la invención</u>							
	EA5	5C3	LOB7/6	3.1.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.29.1	21.4.1	23.25.1, 23.28.1, 24.2.1	CD40 L
EA5	X	x			X		X
5C3	X	X			X	X	X
LOB7/6			X	x		X	X
3.1.1, 1.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.29.1			X	X			X
21.4.1	X	x			X		
23.25.1, 23.28.1, 24.2.1		X	X			X	x
CD40L	x	x	x	X		x	X

Ejemplo VII

Regulación por incremento de moléculas de superficie por anticuerpos anti-CD40

30 Se realizó un ensayo de sangre entera para determinar si los anticuerpos anti-CD40 humanos de la invención regulaban por incremento la expresión de moléculas de superficie en linfocitos B.

Se diluyó sangre entera humana o de primate a 1:1 con medio RPMI y se incubó durante 24 horas con diversas concentraciones de anticuerpos CD40 agonistas o controles. Las células se tiñeron durante 30 minutos (en hielo, en

la oscuridad) para HLA-DR, ICAM, B7-1, B7-2, CD19/CD20, CD40, CD23 y CD71 utilizando reactivos de anticuerpos marcados con fluorocromos de venta en el comercio. Después, las células se analizaron en un FACS-Caliber (Becton-Dickinson). Los linfocitos B se identificaron por selección en células CD19 o CD20 positivas y se determinaron marcadores de activación para esta selección.

- 5 En la Tabla 23 se muestra el factor de aumento máximo de fluorescencia media ($a \leq 1 \mu\text{g/ml}$ anticuerpo) y la CE_{50} media obtenida utilizando uno de los anticuerpos anti-CD40 de la invención que se reivindica (21.4.1).

TABLA 23

Regulación por incremento de moléculas de superficie de linfocitos B por un anticuerpo anti-CD40 de la invención		
	Factor de aumento máximo	CE_{50} (ng/ml)
	Media +/- desv. típ.	Media +/- desv. típ.
MHC II	4,50 +/- 0,52	3,85 +/- 0,35
CD71	2,30 +/- 0,77	0,73 +/- 0,28
ICAM	4,52 +/- 2,42	15,3 +/- 7,3
CD23	69,9 +/- 25,8	19,0 +/- 4,4
B7-2	2,74 +/- 0,14	16,0 +/- 21,9

También se realizaron experimentos para determinar si los anticuerpos anti-CD40 humanos de la invención regulaban por incremento la expresión de moléculas de superficie de células dendríticas derivadas de monocitos.

10 *Preparación de las células dendríticas derivadas de monocitos*

Se extrajo sangre periférica de voluntarios humanos normales. Las células mononucleares se aislaron utilizando tubos Accuspin de Sigma (St. Louis, MO), se lavaron con medio RPMI (Gibco BRL, Rockville, MD) y se colocaron en matraces de cultivo tisular a $5 \times 10^6/\text{ml}$ en medio RPMI completo (que contenía 100 U/ml de penicilina/estreptomicina, tampón HEPES 10 mM, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM; todo ello de Gibco BRL); y suero fetal de ternero al 10 % (Hyclone, Logan, Utah). Después de 3 horas de incubación a 37° C (CO₂ al 5 %), las células no adherentes se retiraron y los linfocitos T se aislaron utilizando columnas de selección (R&D systems, Minneapolis, MN). Las células adherentes se lavaron con medio RPMI y se incubaron durante 7 días en medio RPMI completo complementado con IL-4 10 ng/ml (R&D systems) y GM-CSF 100 ng/ml (R&D systems). Después, las células no adherentes se aislaron, se lavaron y se utilizaron como células dendríticas derivadas de monocitos (CDm) en todos los experimentos. Las células adherentes restantes se retiraron utilizando tripsina / EDTA y se utilizaron en experimentos que empleaban monocitos adherentes.

Para determinar si los anticuerpos anti-CD40 de la invención regulaban por incremento la expresión de marcadores de superficie celular, las células dendríticas derivadas de monocitos se cultivaron con diversas concentraciones de anticuerpos agonistas durante 48-72 horas, seguido de tinción (30 minutos, en hielo, en la oscuridad) para HLA-DR, ICAM, B7-1, B7-2, CD40 y CD83, utilizando reactivos de anticuerpos marcados con fluorocromos de venta en el comercio. Después, las células se analizaron en un FACS-Caliber (Becton-Dickinson).

25 En la Tabla 24 se muestra el factor de aumento máximo de fluorescencia media ($a \leq 1 \mu\text{g/ml}$ anticuerpo) y la CE_{50} media obtenida utilizando uno de los anticuerpos anti-CD40 de la invención que se reivindica (21.4.1).

TABLA 24

Regulación por incremento de moléculas de superficie de células dendríticas por un anticuerpo anti-CD40 de la invención		
	Factor de aumento máximo	CE_{50} (ng/ml)
	Media +/- desv. típ.	Media +/- desv. típ.
MHC II	7,7 +/- 5,6	252 +/- 353
CD83	36,3 +/- 42,2	233 +/- 262
ICAM	10,4 +/- 4,8	241 +/- 140
B7-2	21,9 +/- 9,4	71,4 +/- 44,4

5 Se realizaron experimentos similares con linfocitos B y CDm utilizando diversos anticuerpos anti-CD40 de la invención y marcadores adicionales. Se midió la expresión de moléculas de superficie de linfocitos B (MHC-II, ICAM, B7-1, B7-2 y CD23) como se ha descrito anteriormente pero utilizando 1 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo anti-CD40. Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 25. Se midió la expresión de moléculas de superficie de células dendríticas (MHC-II, ICAM, B7-1, B7-2 y CD83) después de 72 horas, como se ha indicado anteriormente, pero utilizando 1 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo anti-CD40. Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 26. Las Tablas 25-26 muestran factor de aumento de intensidad media +/- desviación típica.

TABLA 25

Regulación por incremento de moléculas de superficie de linfocitos B por anticuerpos anti-CD40 de la invención					
	MHC Clase II	ICAM (CD54)	B7-1 (CD 80)	B7-2 (CD86)	CD23
	Linfocito B	Linfocito B	Linfocito B	Linfocito B	Linfocito B
3.1.1	3,2 +/- 2,6	1,3 +/- 0,2	1,7 +/- 0,2	1,2 +/- 0,4	5,6 +/- 4,8
21.2.1	1,2 +/- 0,2	1,3 +/- 0,9	0,9 +/- 0,5	1,0 +/- 0,04	1,0 +/- 0,1
21.4.1	3,6 +/- 3,0	5,0 +/- 3,0	1,9 +/- 0,8	1,8 +/- 0,7	21,5 +/- 34,8
22.1.1	1,4 +/- 0,5	1,1 +/- 0,2	1,2 +/- 0,3	1,0 +/- 0,1	1,3 +/- 0,2
23.5.1	1,4 +/- 0,5	1,1 +/- 0,2	1,4 +/- 0,6	1,0 +/- 0,1	1,1 +/- 0,2
23.25.1	2,5 +/- 1,1	2,5 +/- 0,9	1,6 +/- 0,4	1,3 +/- 0,2	4,3 +/- 2,3
23.28.1	1,1 +/- 0,2	1,1 +/- 0,2	1,8 +/- 0,6	1,0 +/- 0,1	1,1 +/- 0,4
23.29.1	1,2 +/- 0,2	1,0 +/- 0,2	1,3 +/- 0,6	0,9 +/- 0,2	1,1 +/- 0,1
24.2.1	1,8 +/- 1,0	1,6 +/- 0,8	1,1 +/- 0,4	1,1 +/- 0,2	0,9 +/- 0,6

TABLA 26

Regulación por incremento de moléculas de superficie de células dendríticas por anticuerpos anti-CD40 de la invención					
	MHC Clase II	ICA(CD54)	B7-1 (CD 80)	B7-2 (CD86)	CD83
	CD	CD	CD	CD	CD
3.1.1	4,4 +/- 2,4	1,5 +/- 0,7	1,8 +/- 0,9	23,7 +/- 33,5	15,2 +/- 18,2
21.2.1	1,8 +/- 1,3	1,5 +/- 0,9	0,9 +/- 0,4	7,4 +/- 10,5	10,8 +/- 16,5
21.4.1	5,0 +/- 3,8	3,7 +/- 1,4	1,5 +/- 1,1	12,9 +/- 13,3	48,6 +/- 49,5
22.1.1	2,3 +/- 1,2	1,6 +/- 0,7	1,4 +/- 1,0	16,3 +/- 25,5	12,0 +/- 17,0
23.5.1	2,3 +/- 1,8	1,2 +/- 0,5	1,1 +/- 0,6	10,7 +/- 17,5	9,2 +/- 11,1
23.25.1	2,1 +/- 1,8	2,4 +/- 1,0	1,1 +/- 0,5	3,3 +/- 4,2	13,6 +/- 28,9
23.28.1	2,4 +/- 1,7	2,7 +/- 2,1	1,3 +/- 0,6	10,6 +/- 17,5	18,3 +/- 22,6
23.29.1	2,0 +/- 1,5	1,2 +/- 0,4	0,9 +/- 0,5	8,4 +/- 10,6	10,6 +/- 13,1
24.2.1	4,7 +/- 3,0	2,1 +/- 1,2	3,8 +/- 3,8	56,6 +/- 95,8	31,2 +/- 28,4

10 La Tabla 27 compara la regulación por incremento de moléculas de superficie celular en células dendríticas sobre linfocitos B en función de la proporción del factor de aumento medio en células dendríticas sobre el factor de aumento medio en linfocitos B.

TABLA 27

Regulación por incremento de moléculas de superficie celular en células dendríticas sobre linfocitos B				
	B7-1 (CD80)	B7-2 (CD86)	MHC Clase II	ICAM (CD54)
3.1.1	1,08	19,40	1,38	1,15
21.2.1	1,01	7,37	1,49	1,12
21.4.1	0,77	7,04	1,37	0,74
22.1.1	1,18	16,36	1,61	1,44
23.5.1	0,83	10,54	1,59	1,06
23.25.1	0,66	2,57	0,85	0,98
23.28.1	0,71	10,81	2,16	2,57
23.29.1	0,73	9,07	1,66	1,23
24.2.1	3,48	52,30	2,64	1,35

Ejemplo VIIIPotenciación de secreción de citocinas

5 Se realizó un ensayo con células dendríticas derivadas de monocitos para determinar si los anticuerpos anti-CD40 humanos de la invención potenciaban la secreción de IL-12p40, IL-12p70 e IL-8.

10 Las células dendríticas derivadas de monocitos y los monocitos adherentes se prepararon como se ha descrito anteriormente. Las células se cultivaron en presencia de un anticuerpo anti-CD40 de la invención (21.4.1) o con un anticuerpo anti-hemocianina de lapa californiana (HLC) como control negativo. Las citocinas se midieron en los sobrenadantes a las 24 horas por ELISA (R & D systems). En algunos estudios (véase la Tabla 28), las células dendríticas derivadas de monocitos tratadas con el anticuerpo también se co-estimularon con LPS 100 ng/ml (Sigma), IFN γ 1000 U/ml (R & D systems) o IL-1 β 25 ng/ml (R & D systems).

15 El anticuerpo anti-CD40 potenció la producción de IL-12p40, IL-12p70 e IL-8 tanto en células dendríticas derivadas de monocitos como en monocitos adherentes. La presencia de LPS potenció adicionalmente la producción de IL-12p40 e IL-12p70. Únicamente se detectaron niveles mínimos de citocinas en los sobrenadantes de células dendríticas incubadas con el anticuerpo de control isotipo, anti-HLC. En la Tabla 28 y en las Figuras 3 y 4 se muestran resultados representativos. La Tabla 28 resume las citocinas principales producidas por células dendríticas o monocitos adherentes por 1 μ g/ml de un anticuerpo anti-CD40 de la invención (21.4.1) +/- LPS 100 ng/ml. Como se muestra en la Figura 3, el anticuerpo anti-CD40 potenció la producción de IL-12p40 por células dendríticas humanas. La Figura 4 ilustra la producción de IL-12p70 potenciada por células dendríticas humanas en presencia del anticuerpo y LPS 100 ng/ml.

20

TABLA 28

Potenciación de la secreción de IL-12p40, IL-12p70 e IL-8 por un anticuerpo anti-CD40 de la invención					
Tipo de célula	Tratamiento		Citocina inducida		
	Anticuerpo 1 μ g/ml	LPS 100 ng/ml	IL-12p40 μ g/ml	IL-12p70 μ g/ml	IL-8 μ g/ml
Célula dendrítica	21.4.1	+	32252	1000	ND
	21.4.1	-	1200	76	1200
	anti-HLC	+	14280	352	ND
	anti-HLC	-	200	4	150

(continuación)

Potenciación de la secreción de IL-12p40, IL-12p70 e IL-8 por un anticuerpo anti-CD40 de la invención					
Tipo de célula	Tratamiento		Citocina inducida		
	Anticuerpo 1 µg/ml	LPS 100 ng/ml	IL-12p40 µg/ml	IL-12p70 µg/ml	IL-8 µg/ml
Monocito adherente	21.4.1	-	ND	ND	7000
	21.4.1	+	ND	425	ND
	anti-HLC	-	ND	ND	400
	anti-HLC	+	ND	30	ND

ND = no determinado

Se realizaron experimentos similares utilizando múltiples anticuerpos anti-CD40 de la invención. Las células dendríticas derivadas de monocitos se prepararon como se ha descrito anteriormente y se cultivaron en presencia de diversas concentraciones de los anticuerpos anti-CD40 y se co-estimularon con LPS 100 ng/ml (Sigma). La IL-12p70 en el sobrenadante se midió a las 24 horas por ELISA (R & D Systems) y se determinó el valor CE₅₀ de cada anticuerpo. Los resultados de los experimentos se muestran en la Tabla 29.

TABLA 29

Potenciación de secreción de IL-12p70 en células dendríticas		
Clon de anticuerpo	CD IL-12p70	
	CE ₅₀ µg/ml	Máx pg / ml
21.4.1	0,3	1796-7004
22.1.1	0,1	720-1040
23.25.1	0,2	540-960
23.5.1	0,1	676-1112
24.2.1	0,2	754-3680
3.1.1	0,2	668-960
23.28.1	0,2	1332-1404
23.29.1	0,1	852-900
21.2.1	0,03	656-872

También se sometió a ensayo la capacidad de los anticuerpos anti-CD40 de la invención para potenciar la secreción de IFN- γ de linfocitos T en un ensayo con linfocitos T/células dendríticas alogénico. Para realizar este ensayo, se aislaron linfocitos T y monocitos de sangre periférica de voluntarios sanos. Los monocitos se diferenciaron en células dendríticas utilizando los procedimientos descritos anteriormente. Se cultivaron 1×10^5 linfocitos T obtenidos de un individuo con 1×10^5 células dendríticas obtenidas de un individuo diferente en presencia de un anticuerpo anti-CD40 de la invención o un anticuerpo control. Después de 4 días de cultivo, los sobrenadantes se ensayaron con respecto a la secreción de IFN-gamma por ELISA. Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 30.

TABLA 30

Potenciación de la secreción de IFN-gamma por anticuerpos anti-CD40 de la invención		
Clon de anticuerpo	IFN γ CD/T Alo	
	CE ₅₀ µg/ml	Máx pg/ml
21.4.1	0,3	212
22.1.1	0,3	110-180
23.25.1	0,3	180-232

(continuación)

Potenciación de la secreción de IFN-gamma por anticuerpos anti-CD40 de la invención		
Clon de anticuerpo	IFN γ CD/T Alo	
	CE ₅₀ μ g/ml	Máx pg/ml
23.5.1	0,2	150-240
24.2.1	0,2	111-194
3.1.1	0,1	100-195
23.28.1	0,2	120-190
23.29.1	0,3	134-150
21.2.1	0,03	230-256

Ejemplo IXInducción de citocinas inflamatorias por los anticuerpos anti-CD40 de la invención

5 Los anticuerpos 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1 y 3.1.1 se sometieron a ensayo en un ensayo de liberación de citocinas de sangre entera descrito por Wing y col., Therapeutic Immunol. 2:183-90 (1995) para determinar si a una concentración de 1, 10 y 100 μ g/ml los anticuerpos inducían la producción de citocinas inflamatorias. No se observó liberación significativa de TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , o IL-6 con estos anticuerpos a las concentraciones indicadas en sangre de 10 donantes normales.

Ejemplo X10 Potenciación de inmunogenicidad de la línea celular Jy por anticuerpos anti-CD40

Se cultivaron células JIYOYE CD40 positivas (ATCC CCL 87) ("células Jy") y se conservaron en medio RPMI. Las células JIYOYE se incubaron durante 24 horas con un anticuerpo anti-CD40 de la invención (21.4.1), o con un anticuerpo de isotipo semejante (anti-HLC), en medio RPMI completo. Después las células se lavaron y se trataron durante 60 minutos con mitomicina C 25 mg (Sigma) / medio 7 ml. Después, estas células se cultivaron durante 6 días con linfocitos T humanos aislados a una proporción de 1:100 a 37 °C (CO₂ 5 %). Después los linfocitos T se recogieron, se lavaron y se determinó el nivel de actividad LCT contra células JIYOYE recientes marcadas con cromó 51 (New England Nuclear, Boston, MA). La actividad LCT específica se calculó como % de citólisis específica = (citólisis Jy (rpm) - citólisis espontánea (rpm)) / (citólisis total (rpm) - citólisis espontánea (rpm)).

20 Como se ilustra en la Figura 5, un anticuerpo anti-CD40 de la invención (21.4.1) potenció significativamente la inmunogenicidad contra células Jy tratados con el anticuerpo.

Ejemplo XIModelo tumoral animal

25 Para investigar adicionalmente la actividad antitumoral de los anticuerpos anti-CD40 fabricados de acuerdo con la invención, se diseñó un modelo de ratón SCID color beige para ensayar el efecto *in vivo* del anticuerpo sobre el crecimiento tumoral.

30 Los ratones SCID de color beige se obtuvieron en Charles River y se permitió su aclimatación una semana antes de su utilización. Se inyectaron células tumorales (células Daudi (ATCC CCL 213), células K562 CD40 (-) (ATCC CCL 243) y células Raji CD40 (+) (ATCC CCL 86), células de cáncer de mama BT474 (ATCC HTB 20) o células PC-3 de próstata (ATCC CRL 1435)) por vía subcutánea a una concentración de 1×10^7 células/animal. En algunos casos, junto con las células tumorales, se inyectaron linfocitos T (5×10^5) y células dendríticas (1×10^5) del mismo donante humano. También se inyectó un anticuerpo anti-CD40 de la invención, o un control de isotipo semejante (anti-HLC), por vía intraperitoneal, inmediatamente antes de la inyección tumoral (sólo una inyección). Después se midió el crecimiento tumoral. A continuación se describen los experimentos específicos.

35 En un experimento, se inyectó un anticuerpo anti-CD40 de la invención (21.4.1), o un control de isotipo semejante (anti-HLC), por vía intraperitoneal, a una dosis de 10 mg/kg inmediatamente antes de la inyección tumoral (sólo una inyección). Las células tumorales (células Daudi) se inyectaron por vía subcutánea a una concentración de 1×10^7 células/animal. El crecimiento tumoral se midió con calibradores los días 17, 19, 20, 21, 25, 26, 27 y 28 después del implante en presencia de linfocitos T humanos y células dendríticas. Como se muestra en la Figura 6, el anticuerpo anti-CD40 inhibió el crecimiento tumoral aproximadamente al [60] %.

40

5 En otro experimento, se inyectó un anticuerpo anti-CD40 de la invención (21.4.1), o un control de isotipo semejante (anti-HLC), por vía intraperitoneal, a una dosis de 0,1 mg/kg, 1 mg/kg o 10 mg/kg inmediatamente antes de la inyección tumoral (sólo una inyección). Las células tumorales (células K562) se inyectaron por vía subcutánea a una concentración de 1×10^7 células/animal. En este experimento se inyectaron linfocitos T (5×10^5) y células dendríticas (1×10^5) del mismo donante humano junto con las células tumorales. El crecimiento tumoral se midió con calibradores los días 17, 19, 20, 21, 25, 26, 27 y 28 después del implante. Como se muestra en la Figura 7, el anticuerpo anti-CD40 inhibió el crecimiento tumoral al 60-85 %.

10 En otro experimento, se inyectó un anticuerpo anti-CD40 de la invención (21.4.1, 23.29.1 o 3.1.1) o un control de isotipo semejante (anti-HLC), por vía intraperitoneal, inmediatamente antes de la inyección tumoral (sólo una inyección). El anticuerpo de control de isotipo semejante y el anticuerpo 21.4.1 se inyectaron a una dosis de 1 mg/ml. Los anticuerpos 23.29.1 y 3.1.1 se inyectaron a una dosis de 1, 0,1, 0,01, 0,001 o 0,0001 mg/kg. Las células tumorales (células K562) se inyectaron por vía subcutánea a una concentración de 1×10^7 células/animal. En este experimento se inyectaron linfocitos T (5×10^5) y células dendríticas (1×10^5) del mismo donante humano junto con las células tumorales. Después se midió el crecimiento tumoral con calibradores el día 28 después del implante. Los resultados de este experimento se muestran en las Figuras 8 y 9. Cada punto en las figuras representa una medición de un animal individual.

20 En otro experimento, se inyectó un anticuerpo anti-CD40 de la invención (21.4.1), o un control de isotipo semejante (anti-HLC), por vía intraperitoneal, inmediatamente antes de la inyección tumoral (sólo una inyección). Los anticuerpos se inyectaron a una dosis de 1, 0,1, 0,01, 0,001 o 0,0001 mg/kg. Se inyectaron las células tumorales (células Raji) por vía subcutánea a una concentración de 1×10^7 células/animal. En algunos animales, se inyectaron linfocitos T (5×10^5) y células dendríticas (1×10^5) del mismo donante humano junto con las células tumorales. Después se midió el crecimiento tumoral con calibradores el día 28 después del implante. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 10. Cada punto en la Figura representa una medición de un animal individual.

25 En otro experimento más, se inyectó un anticuerpo anti-CD40 de la invención (21.4.1, 23.28.1, 3.1.1 o 23.5.1), o un control de isotipo semejante (anti-HLC), por vía intraperitoneal, inmediatamente antes de la inyección tumoral (sólo una inyección). Los anticuerpos se inyectaron a una dosis de 1 o 0,1 mg/kg. Se inyectaron las células tumorales (células Raji) por vía subcutánea a una concentración de 1×10^7 células/animal. Después se midió el crecimiento tumoral con calibradores el día 28 después del implante. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 11. Cada punto en la figura representa una medición de un animal individual.

30 En otro experimento adicional, se inyectó un anticuerpo anti-CD40 de la invención (21.4.1, 23.29.1, o 3.1.1), o un control de isotipo semejante (anti-HLC), por vía intraperitoneal, inmediatamente antes de la inyección tumoral (sólo una inyección). Los anticuerpos se inyectaron a una dosis de 1 mg/kg. Se inyectaron las células tumorales (células de cáncer de mama BT474) por vía subcutánea a una concentración de 1×10^7 células/animal. Se inyectaron linfocitos T (5×10^5) y células dendríticas (1×10^5) procedentes del mismo donante humano junto con las células tumorales. Después se midió el crecimiento tumoral con calibradores el día 39 después del implante. Como se muestra en la Figura 12, todos los anticuerpos inhibieron el crecimiento tumoral de cáncer de mama. Cada punto en la figura representa una medición de un animal individual.

40 En otro experimento adicional, se inyectó un anticuerpo anti-CD40 de la invención (3.1.1) o un control de isotipo semejante (anti-HLC), por vía intraperitoneal, inmediatamente antes de la inyección tumoral (sólo una inyección). Los anticuerpos se inyectaron a una dosis de 1 mg/kg. Las células tumorales (células tumorales PC-3 de próstata) se inyectaron por vía subcutánea a una concentración de 1×10^7 células/animal. Después se midió el crecimiento tumoral con calibradores el día 41 después del implante. Como se muestra en la Figura 13, el anticuerpo anti-CD40 inhibió el crecimiento tumoral de próstata aproximadamente al 60%. Cada punto en la figura representa una medición de un animal individual.

Ejemplo XII

Supervivencia de ratones SCID de color beige inyectados con células tumorales Daudi y tratados con los anticuerpos anti-CD40 de la invención

50 En otro experimento, se inyectó un anticuerpo anti-CD40 de la invención, o un control de isotipo semejante (una inyección), por vía intraperitoneal, inmediatamente antes de la inyección tumoral. Los anticuerpos se inyectaron a una dosis de 1 o 0,1 mg/kg. Las células tumorales (células Daudi) se inyectaron por vía intravenosa a una dosis de 5×10^6 células/animal. Después se controló la supervivencia de los animales. Como se muestra en la Figura 14, todos los anticuerpos anti-CD40 ensayados prolongaron, durante al menos seis días, la supervivencia de los ratones a los que se habían inyectado los tumores.

55 La Tabla 31 indica el valor DE_{50} de los anticuerpos anti-CD40 en los diferentes modelos de tumores sólidos descritos en el Ejemplo XI. La Tabla 31 resume la actividad anti-tumoral *in vivo* de algunos de los anticuerpos anti-CD40 de la invención en ratones SCID. Además, la tabla indica el valor DE_{50} de los anticuerpos anti-CD40 en el modelo tumoral sistémico Daudi descrito anteriormente en el Ejemplo XII.

TABLA 31

DE ₅₀ de los anticuerpos anti-CD40 de la invención <u>utilizando diferentes modelos tumorales <i>in vivo</i> en ratones SCID</u>				
Anticuerpo	K562 CD40 (-) y T/CD <i>vía subcutánea</i> (mg/kg)	Raji CD40 (+) y T/CD <i>vía subcutánea</i> (mg/kg)	Raji CD40 (+) <i>vía subcutánea</i> (mg/kg)	Daudi CD40 (+) <i>vía subcutánea</i> (mg/kg)
21.4.1	0,005	0,0008	0,016	0,1
22.1.1	0,01	NR	> 1,0	0,1
23.25.1	≥ 1,0	NR	> 1,0	NR
23.5.1	> 1,0	NR	≥ 1,0	NR
24.2.1	> 1,0	NR	> 1,0	NR
3.1.1	0,02	NR	≥ 0,1	≤ 0,1
23.28.1	> 1,0	NR	≥ 1,0	0,1
23.29.1	0,009	NR	> 1,0	≤ 0,1
21.2.1	s 1,0	NR	NR	NR

NR = no realizado

Ejemplo XIII

Determinación de las constantes de afinidad (K_D) de los anticuerpos anti-CD40 completamente humanos por BIAcore

- 5 Se realizaron mediciones de afinidad de anticuerpos purificados por resonancia de plasmón superficial utilizando el instrumento BIAcore 3000, siguiendo los protocolos del fabricante.

10 El instrumento biodetector de análisis de interacción bioespecífica (BIAcore) utiliza resonancia de plasmón superficial para medir interacciones moleculares en una microplaca detectora CM5. Los cambios en los índices refractarios entre dos medios, vidrio y dextrano carboximetilado, producidos por la interacción de moléculas en el lado dextrano de la microplaca detectora, se miden y se presentan como cambios en unidades reflectantes (UR) arbitrarias como se detalla en las especificaciones técnicas del fabricante.

15 La superficie de dextrano carboximetilado de una célula de flujo en una microplaca detectora se activó mediante derivatización con N-hidroxisuccinimida 0,05 M mediada por N-etil-N'-(dimetilaminopropil) carbodiimida 0,2 M durante 7 minutos. La proteína de fusión CD40-Ig (descrita en el Ejemplo I) se inyectó manualmente en la célula de flujo a una concentración de 5 µg/ml en Na acetato 10 mM, pH 3,5, a una tasa de 5 µl/min y se inmovilizó covalentemente en la superficie de la célula de flujo con la cantidad de UR deseadas. La desactivación de ésteres de N-hidroxisuccinimida que no reaccionaron se realizó utilizando clorhidrato de etanolamina 1 M, pH 8,5. Después de la inmovilización, las células de flujo se limpiaron de cualquier material que no había reaccionado o pobremente unido con 5 inyecciones de regeneración de 5 µl de NaOH 50 mM hasta conseguir una línea basal estable. La célula de flujo 2, una superficie de alta densidad, midió aproximadamente 300 UR después de la preparación de la superficie y la célula de flujo 3, una superficie de baja densidad, midió aproximadamente 150 UR. Para la célula de flujo 1, la superficie blanco activada, se inyectaron 35 µl de tampón de Na acetato 10 mM durante la inmovilización en lugar de antígeno. La célula de flujo 4 contenía aproximadamente 450 UR de CTLA4-Ig inmovilizada, un control con antígeno irrelevante.

- 25 Se preparó una dilución en serie de cada anticuerpo en el intervalo de concentración de 100 µg/ml a 0,1 µg/ml en semi-logaritmos. El caudal se estableció a 5 µl/min y se inyectaron 25 µl de cada muestra puntal de concentración sobre la microplaca detectora con una inyección de regeneración de 5 µl de NaOH 50 mM entre cada concentración de anticuerpo inyectado. Los datos se analizaron utilizando el programa informático BIAevaluation 3.0.

30 En experimentos de cinética de orientación inversa, el anticuerpo 21.4.1 se inmovilizó sobre la superficie de la microplaca detectora utilizando el protocolo descrito anteriormente. Se usó anti-HLC como una superficie de anticuerpo de control. El antígeno, proteína de fusión CD40-Ig, se inyectó en el intervalo de concentración de 100 µg/ml a 0,1 µg/ml.

La Tabla 32 indica mediciones de afinidad de anticuerpos anti-CD40 representativos de la presente invención:

TABLA 32

Mediciones de afinidad de anticuerpos anti-CD40 de la invención			
Anticuerpo	K _{on} (1/Ms)	K _{off} (1/s)	K _D (M)
3.1.1	1,12 x 10 ⁶	3,31 x 10 ⁻⁵	3,95 x 10 ⁻¹¹
10.8.3	2,22 x 10 ⁵	4,48 x 10 ⁻⁷	2,23 x 10 ⁻¹²
15.1.1	8,30 x 10 ⁴	2,83 x 10 ⁻⁷	4,05 x 10 ⁻¹²
21.4.1	8,26 x 10 ⁴	2,23 x 10 ⁻⁵	3,48 x 10 ⁻¹⁰
22.1.1	9,55 x 10 ⁵	1,55 x 10 ⁻⁴	2,79 x 10 ⁻¹⁰
23.25.1	3,83 x 10 ⁵	1,65 x 10 ⁻⁷	7,78 x 10 ⁻¹²
23.28.1	7,30 x 10 ⁵	8,11 x 10 ⁻⁵	1,61 x 10 ⁻¹⁰
23.29.1	3,54 x 10 ⁵	3,90 x 10 ⁻⁵	7,04 x 10 ⁻¹¹

Ejemplo XIVMapeo epitópico de anticuerpos anti-CD40

5 Se realizaron ensayos de unión usando el antígeno de fusión Proteína A purificada - Fc de IgG1 CD40 humano. La proteína de fusión CD40-IgG1 Fc humana se clonó en Pfizer. La proteína de fusión IgG1 CD40 humana se expresó en una línea celular de mamífero y se purificó sobre una columna de proteína A. La pureza del antígeno de fusión se evaluó mediante SDS/PAGE.

10 CD40 tiene una estructura de una proteína de transmembrana de tipo I típica. La molécula madura está compuesta por 277 aminoácidos. El dominio extracelular de CD40 consta de cuatro dominios ricos en cisteína similares a TNFR. Véase, por ejemplo, Neismith y Sprang, TIBS 23:74-79 (1998); van Kooten y Banchereau, J. Leukocyte Biol. 67:2-17 (2000); Stamenkovic y col. EMBO J. 8:1403-1410 (1989).

Unión de anticuerpos anti-CD40 a CD40 humano en condiciones reductoras y no reductoras:

15 Dado que el dominio extracelular de CD40 consta de cuatro dominios ricos en cisteína, la alteración de los enlaces intramoleculares, con un agente reductor, puede modificar la reactividad del anticuerpo. Para determinar si la alteración de los enlaces intramoleculares, con un agente reductor, modificaba la reactividad de los anticuerpos anti-CD40 seleccionados de la invención, se cargó CD40-hIgG purificado en SDS/PAGE (gel al 4-20 %) en condiciones no reductoras (NR) o reductoras (R). Se realizó SDS/PAGE mediante el procedimiento de Laemmli, utilizando un sistema mini-gel. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon utilizando PBS, que contenía leche desnatada en polvo al 5% (p/v), durante al menos 1 hora antes del revelado y se exploró durante 1 hora con cada anticuerpo. Se detectaron anticuerpos anti-CD40 utilizando anti-inmunoglobulinas humanas de cabra conjugadas con HRP (dilución 1:8.000; catálogo N° A-8667 de Sigma). Las membranas se revelaron utilizando quimioluminiscencia potenciada (ECL®; Amersham Bioscience) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

25 Después se realizó exploración por transferencia de Western con cuatro anticuerpos anti-CD40 de la invención: 21.4.1, 23.25.1, 23.29.1 y 24.2.1 (1 µg/ml), seguido por anti-IgG humana de cabra conjugada con HRP (dilución 1:8000). Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 15. Los resultados indican que los anticuerpos 21.4.1, 23.25.1, 23.29.1 y 24.2.1 se unen a CD40 en condiciones reductoras pero no se unen a CD40 en condiciones no reductoras, por tanto, los anticuerpos reconocen un epítipo conformacional.

Unión de anticuerpos anti-CD40 a proteínas con delección de dominios de CD40 humano:

30 La región extracelular de CD40 incluye cuatro dominios repetidos similares a TNFR (denominados D1-D4). Véase, por ejemplo, Neismith y Sprang, TIBS 23: 74-79 (1998); van Kooten y Banchereau, J. Leukocyte Biol. 67: 2-17 (2000); Stamenkovic y col., EMBO J. 8: 1403-1410 (1989). La Figura 16 muestra la secuencia de aminoácidos de los dominios D1-D4 de CD40 de ratón y de ser humano. Para investigar la contribución de las diferentes regiones de la molécula CD40 en la presentación del epítipo, se construyó una serie de mutantes con delección de dominios.

35 Para fabricar las construcciones de delección de CD40 humano, se amplificó por PCR todo el dominio extracelular de CD40 humano (aminoácidos 1-193) a partir de ADNc de linfocitos B humanos (CD19+) (paneles de ADNc de tejido múltiple, Catálogo N° K1428-1, de Clontech) utilizando cebadores específicos de secuencia, y en el extremo C se

añadió una etiqueta de 6XHis. Se utilizó un cebador 5' CD40 humano 5'-GCAAGCTTCACCAATGGT TCGTCTGCCTCTGCAGTG-3' (SEC ID N°: 135) con diferentes combinaciones de cebadores 3' para clonar las moléculas CD40 de longitud completa y truncadas. El cebador 3' utilizado para clonar el dominio extracelular de longitud completa de CD40 humano fue: 5'-TCAGTGATGGTGATGGTGATGTCTCAGCCGAT CCTGGGGACCA-3' (SEC ID NO: 136). El cebador 3' utilizado para clonar los dominios D1-D3 de CD40 humano fue: 5'-TCAGTGATGGTGATGGTGATGTGGGCA GGGCTCGCGATGGTAT-3' (SEC ID N°: 137). El cebador 3' utilizado para clonar los dominios D1-D2 de CD40 humano fue: 5'-TCAGTGATGGTGATGGTGATGA CAGGTGCAGATGGTGTCTGTT-3' (SEC ID N°: 138). Después de generar estas construcciones de ADNc de CD40 truncado, se expresaron en la línea celular 293F utilizando el vector pCR3.1 (Invitrogen). Las proteínas de fusión CD40-6XHis se purificaron por elución a partir de una columna de níquel.

Las secuencias de aminoácidos de estos cuatro mutantes de delección de muestran en la Tabla 33

Tabla 33

Proteínas de fusión CD40 - etiqueta His	
Mutante de delección:	Secuencia de aminoácidos (la secuencia líder se indica subrayada)
CD40 Humano-6XHis (dominio extracelular de longitud completa)	<u>MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINS</u> QCCSLCQPGQKLVS DCTEFTETECLPC GESEFLDTWNRETHCHQH KYCDPNLGLRVQQKGT SETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLHRS CSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEK CHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVC GPQDRHHHHHH (SEC ID N°: 139)
CD40 humano (D1-D3)- 6xHis	<u>MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINS</u> QCCSLCQPGQKLVS DCTEFTETECLPC GESEFLDTWNRETHCHQH KYCDPNLGLRVQQKGT SETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLHRS CSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPHHHHHH (SEC ID N°: 140)
Mutante de delección:	Secuencia de aminoácidos (la secuencia líder se indica subrayada)
CD40 humano (D1-D2)- 6Xhis	<u>MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINS</u> QCCSLCQPGQKLVS DCTEFTETECLPC GESEFLDTWNRETHCHQH KYCDPNLGLRVQQKGT SETDTICTCHHHHHH (SEC ID N°: 141)

Para expresar estas construcciones de delección del CD40 humano, las construcciones se clonaron en el vector pCR3.1 (Invitrogen), y la expresión se evaluó en diversas líneas de células 293F estables y transfectadas de manera transitoria. Los sobrenadantes de células 293F transfectadas de manera transitoria se analizaron por ELISA y Transferencia de Western con respecto a la unión a los anticuerpos 21.4.1, 23.25.1, 23.29.1 and 24.2.1.

Los ensayos ELISA se preformaron utilizando sobrenadante de células 293F transfectadas con diferentes construcciones de CD40. Placas ELISA se revistieron con anticuerpos policlonales anti-CD40 humano de cabra (R&D catálogo N° AF 632) o anticuerpos policlonales anti-CD40 de ratón de cabra (R&D catálogo N° AF 440) diluidos a 1 µg/ml en tampón de revestimiento de placas ELISA. La expresión de las construcciones de CD40 en células 293F se confirmó por detección con anti-CD40 humano de cabra biotinilado (R&D catálogo N° BAF 632), anti-CD40 de ratón de cabra (R&D catálogo N° BAF 440) o anticuerpo anti-His (extremo C) conjugado con HRP (Invitrogen, Catálogo N° 46-0707). La unión de los anticuerpos anti-CD40 humanos se detectó con anti-IgG humana de cabra conjugada con HRP (FC specific Caltag H10507), diluida a 1:2.000. Los resultados, como se muestran en la Tabla 34, indican que la mayor parte del epítoto, si no todo, reconocido por los mAbs 21.4.1, 23.28.1 y 23.29.1 se localiza en la región D1-D2 del CD40 mientras que el epítoto del mAb 24.2.1 se localiza, al menos en parte, en el dominio D3-D4. Como control se utilizó una proteína de fusión Fc de conejo-CD40 humano para confirmar la especificidad de la unión al anticuerpo.

Tabla 34

ELISA: unión de anticuerpos a mutantes de delección de CD40			
	CD40 humano (D1-D2)-6Xhis	CD40 humano (D1-D3)-6XHis	CD40 humano -6XHis
21.4.1	+	+	+
23.25.1	+	+	+
	CD40 humano (D1-D2)-6Xhis	CD40 humano (D1-D3)-6XHis	CD40 humano -6XHis
23.29.1	+	+	+
24.2.1	-	+	+
anti-His	+	+	+
anti-Rblg	NR	NR	NR

También se analizaron las construcciones de delección de CD40 mediante el análisis de Transferencia de Western. Los resultados se muestran en la Tabla 35. Los resultados de ELISA muestran que el sitio de unión de los anticuerpos 21.4.1, 23.25.1, 23.29.1 y 24.2.1 implica los dominios D1-D3. Los resultados también muestran que el sitio de unión para los anticuerpos 21.4.1, 23.25.1 y 23.29.1 implican los dominios D1-D2 y que el sitio de unión del anticuerpo 24.2.1 implica el dominio D3.

5

Tabla 35

Transferencia de Western: unión de anticuerpos a mutantes de delección de CD40		
	CD40 humano (D1-D3)-6Xhis	CD40 humano -6Xhis
21.4.1	+	+
23.25.1	+	+
23.29.1	+	+
24.2.1	+	+
anti-His	+	+
Anti-Rblg	NR	NR

Unión de anticuerpos anti-CD40 a CD40 de ratón:

Se estableció determinar la capacidad de los anticuerpos 21.4.1, 23.25.1, 23.29.1 y 24.2.1 para unirse a CD40 de ratón.

10

Para este experimento, se amplificó el CD40 de ratón a partir de ADNc de linfocitos B de ratón. La proteína de fusión CD40 (D1-D3) de ratón-6xHis se clonó en pCR3.1, que utiliza el promotor del CMV para dirigir la transcripción. El cebador 5' utilizado para clonar el dominio extracelular de CD40 de ratón fue: 5'-TGCAAGCTTCACCATGGTGTCTTTGCCTCGGCTGTG-3'. El cebador 3' utilizado para clonar los dominios D1-D3 de CD40 de ratón fue: 5'-GTCCTCGAGTCAGTGATGGTGTGGTGTGGGCAGGGATGACAGAC-3'. Las construcciones de ADNc de ratón y de ser humano se transfectaron en células 293F de manera transitoria. La expresión de CD40 recombinante se detectó por ELISA utilizando anticuerpos policlonales contra CD40 de ratón y de ser humano, anticuerpos anti-His y anticuerpos 21.4.1, 23.25.1, 23.29.1 y 24.2.1 anti-CD40. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Tabla 36. Este experimento demuestra que todos los anticuerpos son específicos contra CD40 humano y no reaccionan en cruzado con CD40 de ratón.

15

20

Tabla 36

Reactividad cruzada de CD40 de ratón y de ser humano		
	CD40(D1-D3) de ratón-6Xhis	CD40(D1-D3) de ser humano-6XHis
21.4.1	No	Si
23.25.1	No	Si
23.29.1	No	Si
24.2.1	No	Si
anti-CD40 humano de cabra	No	Si
anti-CD40 de ratón de cabra	Si	No
Anti-His	Si	Si

Unión de anticuerpos anti-CD40 al CD40 quimérico de ser humano/ratón:

Dado que los anticuerpos 21.4.1, 23.25.1, 23.29.1 y 24.2.1 no se unen a CD40 de ratón, se construyeron proteínas CD40 quiméricas de ser humano/ratón para mapear más definitivamente los epítopes de estos anticuerpos.

- 5 Para la construcción de fusiones en marco de las proteínas quiméricas de CD40 de ser humano y ratón, se utilizaron sitios de restricción exclusivos en los límites de los dominios CD40 en idénticas posiciones en el ADNc de CD40 tanto de ser humano como de ratón. Se generaron diversas construcciones de ADNc de CD40 utilizando el sitio de restricción EcoRI al final en el extremo del dominio 1 (nucleótido 244, aminoácido 64) y el sitio de restricción BanI en el extremo del dominio 2 (nucleótido 330, aminoácido 94) (Figura 17).
- 10 Se amplificaron diversos dominios CD40 por PCR y se ligaron. Esta estrategia permitió sustituir diversos dominios de CD40 de ratón por los dominios homólogos de CD40 humano. Las construcciones obtenidas se muestran en la Figura 18.

Después se determinó si los anticuerpos 21.4.1, 23.25.1, 23.29.1 y 24.2.1 eran capaces de unirse a las proteínas CD40 quiméricas de ratón/ser humano por ELISA. Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 37.

- 15 Como se muestra en la Tabla 37, los mAb 21.4.1 y 23.25.1 reconocen un epítipo que se localiza parcialmente en D1 y parcialmente en D2; el mAb 23.29.1 reconoce un epítipo localizado principalmente sino completamente en D2; y el mAb 24.2.1 reconoce un epítipo localizado en D2 y D3.

Tabla 37

Unión de anticuerpos a proteínas CD40 quiméricas						
Anticuerpo	D1Hu	D2Hu	D3Hu	D1, D2Hu	D2, D3Hu	D1, D3Hu
21.4.1	No	No	No	Si	No	No
23.25.1	No	No	No	Si	No	No
23.29.1	No	Si	No	Si	Si	No
24.2.1	No	No	No	No	Si	No

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal, o una parte de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a y activa el CD40 humano, en el que el epítipo reconocido por dicho anticuerpo o por dicha parte no se solapa con el sitio de unión del ligando de CD40, en el que dicho anticuerpo o dicha parte inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*, y en el que dicho anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que:
- (a) las secuencias de aminoácidos de la CDR1, CDR2 y CDR3 de dicha cadena pesada son las de un dominio variable de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en:
- 10 i) el dominio variable de cadena pesada de 21.4.1 (Nº de Depósito ATCC PTA-3605);
 ii) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 42;
 y
 iii) un dominio variable de cadena pesada codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEC ID Nº: 41; y
- (b) las secuencias de aminoácidos de la CDR1, CDR2 y CDR3 de dicha cadena ligera son las de un dominio variable de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste en:
- 15 i) el dominio variable de cadena ligera de 21.4.1 (Nº de Depósito ATCC PTA-3605);
 ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 44; y
 iii) un dominio variable de cadena ligera codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEC ID Nº: 43.
2. El anticuerpo, o parte de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:
- (a) dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en:
- 20 i) el dominio variable de cadena pesada de 21.4.1 (Nº de Depósito ATCC PTA-3605);
 ii) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 42;
 y
 iii) un dominio variable de cadena pesada codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEC ID Nº: 41; y
- (b) dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste en:
- 25 i) el dominio variable de cadena ligera de 21.4.1 (Nº de Depósito ATCC PTA-3605);
 ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 44; y
 iii) un dominio variable de cadena ligera codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEC ID Nº: 43.
3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:
- 30 (a) dicha cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- i) la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 21.4.1 (Nº de Depósito ATCC PTA-3605);
 ii) la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 46, o dicha secuencia de aminoácidos sin la secuencia señal; y
 35 iii) la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEC ID Nº: 45, o dicha secuencia de aminoácidos codificada sin la secuencia señal; y
- (b) dicha cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- i) la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 21.4.1 (Nº de Depósito ATCC PTA-3605);
 ii) la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 48, o dicha secuencia de aminoácidos sin la secuencia señal; y
 40 iii) la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEC ID Nº: 47, o dicha secuencia de aminoácidos codificada sin la secuencia señal.
4. El anticuerpo, o parte de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las secuencias de aminoácidos de la CDR1, CDR2 y CDR3 de dicha cadena pesada y las secuencias de aminoácidos de la CDR1, CDR2 y CDR3 de dicha cadena ligera son las secuencias de aminoácidos de la CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEC ID Nº: 42 y las secuencias de aminoácidos de la CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEC ID Nº: 44, respectivamente.
- 45 5. El anticuerpo o parte de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las secuencias de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada de dicha cadena pesada y del dominio variable de cadena ligera de dicha cadena ligera son la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 42 y la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 44, respectivamente.
- 50 6. Un anticuerpo monoclonal que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID Nº: 46 sin la secuencia señal y la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID Nº: 48 sin la secuencia señal.

7. Un anticuerpo monoclonal que es 21.4.1 (Nº de Depósito ATCC PTA-3605) o un anticuerpo que tiene las mismas secuencias de aminoácidos que 21.4.1 (Nº de Depósito ATCC PTA-3605).
8. Un anticuerpo monoclonal humanizado, quimérico o humano, o parte de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a, y activa, el CD40, en el que dicho anticuerpo o dicha parte inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* y en el que el anticuerpo o parte de unión a antígeno:
- 5
- (a) compite en cruzado por la unión a CD40 con el anticuerpo 21.4.1 (Nº de Depósito ATCC PTA-3605); o
 - (b) se une al mismo epítotope de CD40 que el anticuerpo 21.4.1 (Nº de Depósito ATCC PTA-3605).
9. El anticuerpo, o parte de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones 1-8, en el que dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno tiene al menos una propiedad seleccionada del grupo que consiste en:
- 10
- (a) no unirse a linfocitos B de ratón, rata, perro y/o conejo;
 - (b) unirse a linfocitos B humanos, de mono cinomolgo y/o rhesus;
 - (c) tener una selectividad por CD40 que es al menos 100 veces mayor que su selectividad por el activador del receptor del factor nuclear kappa B (RANK), 4-1BB (CD137), el receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR-1) y el receptor del factor de necrosis tumoral 2 (TNFR-2);
 - 15 (d) unirse a CD40 con un valor K_D de 4×10^{-10} M o menor;
 - (e) tener un valor K_{off} para CD40 de $2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menor;
 - (f) inhibir el crecimiento tumoral *in vivo* en presencia de linfocitos T humanos y/o de células dendríticas humanas;
 - (g) inhibir el crecimiento de tumores CD40 positivos en ausencia de células inmunitarias humanas;
 - 20 (h) aumentar la expresión de ICAM, CMH-II, B7-2, CD71, CD23 y/o CD71 sobre la superficie de linfocitos B humanos;
 - (i) aumentar la secreción de IL-12p40, IL-12p70 y/o IL-8 por células dendríticas humanas;
 - (j) aumentar la expresión de ICAM, CMH-II, B7-2, y/o CD83 sobre la superficie de células dendríticas humanas;
 - (k) aumentar la expresión del interferón gamma por linfocitos T humanos durante una estimulación alogénica;
 - 25 (l) unirse a CD40 humano en presencia de CD40L humano; y
 - (m) unirse a un epítotope de CD40 humano contenido en el dominio 1 y dominio 2 del dominio extracelular de CD40.
10. El anticuerpo o parte de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 que es:
- 30
- (a) una inmunoglobulina G (IgG), una IgM, una IgE, una IgA o una molécula IgD, o derivada de estas; o
 - (b) un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento F_v , un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo biespecífico.
11. Una línea celular que produce el anticuerpo o parte de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
- 35
12. La línea celular de acuerdo con la reivindicación 11 que produce el anticuerpo 21.4.1 (Nº de Depósito ATCC PTA-3605) o un anticuerpo que tiene las mismas secuencias de aminoácidos que el anticuerpo 21.4.1 (Nº de Depósito ATCC PTA-3605).
- 40
13. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o una parte de unión a antígeno de la misma, una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o una parte de unión a antígeno de la misma, o secuencias de nucleótidos que codifican las cadenas tanto ligera como pesada o partes de unión a antígeno de las mismas, de un anticuerpo o de una parte de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de la reivindicaciones 1-10.
- 45
14. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 13, en la que dicha molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:
- (a) una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada o una parte de unión a antígeno de la misma de 21.4.1 (Nº de Depósito ATCC PTA-3605);
 - (b) una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera o una parte de unión a antígeno de la misma de 21.4.1 (Nº de Depósito ATCC PTA-3605);
 - (c) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 42, 44, 46 y 48, o dicha secuencia de aminoácidos sin una secuencia señal si esta está presente; y
 - 50 (d) una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 41, 43, 45 y 47, o dicha secuencia sin una secuencia de nucleótidos que codifique una secuencia señal si esta está presente.
15. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en el que el vector comprende opcionalmente una secuencia de control de expresión unida operativamente a la molécula de ácido nucleico.
- 55

16. Una célula huésped que comprende:
- 5 (a) una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o una parte de unión a antígeno de la misma y una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o una parte de unión a antígeno de la misma, o una secuencia nucleótidos que codifica las cadenas tanto pesada como ligera o partes de unión a antígeno de las mismas, de un anticuerpo o parte de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10; o
- (b) el vector de acuerdo con la reivindicación 15.
17. Un procedimiento de fabricación de un anticuerpo anti-CD40 o una parte de unión a antígeno del mismo, que comprende cultivar la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 16 o la línea celular de acuerdo con la reivindicación 11 en condiciones adecuadas y recuperar dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno.
- 10 18. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o parte de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
19. El anticuerpo o parte de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso en el tratamiento de cáncer o para potenciar una respuesta inmunitaria.
- 15 20. El anticuerpo o parte de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso en el tratamiento de un tumor CD40 negativo.
- 20 21. Un medicamento que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o una parte de unión a antígeno de la misma y una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o una parte de unión de la misma, o una secuencia de nucleótidos que codifica las cadenas tanto pesada como ligera o partes de unión a antígeno de las mismas, de un anticuerpo o parte de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para su uso en el tratamiento de cáncer o para potenciar una respuesta inmunitaria.

Fig. 1 - Alineamiento de secuencias de proteínas de dominio variable de anticuerpos con secuencias de la línea germinal (LG) (las CDR se indican subrayadas; las mutaciones de la germinal se indican en negrita/sombreadas)

Fig. 1A

Línea germinal: V=A3/A19, J=JK1

3.1.1 DIVLTSPLS LPVTPGPAS ISCRSSQILL YNGYNFLDM YLRPGQSQ LLIYLGSNRA SGVDPRESGS SGSDTFTLKI SREAEADV YYCHQALQTP RTGQGTKVE IK
 7.1.2 DIVNTSPLS LPVTPGPAS ISCRSSQILL YNGYNFLDM YLRPGQSQ LLIYLGSNRA SGVDPRESGS SGSDTFTLKI SREAEADV YYCHQALQTP RTGQGTKVE IK
 GL DIVNTQSPSS LPVTPGEPAS ISCRSSQILL HSNGYNYLDM YLRPGQSQ LLIYLGSNRA SGVDPRESGS SGSDTFTLKI SREAEADV YYCHQALQTP RTGQGTKVE IK

Fig. 1B

Línea germinal: V=A3/A19, J=JK2

15.1.1 DIVNTSPLS LPVTPGPAS ISCRSSQILL HTNGYNYFDM YLRPGQSQ LLIYLGSNRA SGVDPRESGS SGSDTFTLKI SREAEADV YYCHQALQTP YRGQGTKLE IK
 GL DIVNTQSPSS LPVTPGEPAS ISCRSSQILL HSNGYNYLDM YLRPGQSQ LLIYLGSNRA SGVDPRESGS SGSDTFTLKI SREAEADV YYCHQALQTP YRGQGTKLE IK

Fig. 1C

Línea germinal: V=I5, J=JK4

10.8.3 DIQNTQSPSS VSASVGRVIT ITCRASQPI SMLAWYQRP GKAPKLIYS ASGLQGVPR FSGSGSGTD FTLTISSLPQ EDFFATYICQ EDFFATYICQ EDFFATYICQ EDFFATYICQ EDFFATYICQ EDFFATYICQ
 21.4.1 DIQNTQSPSS VSASVGRVIT ITCRASQPI SMLAWYQRP GKAPKLIYT ASTLQGVPR FSGSGSGTD FTLTISSLPQ EDFFATYICQ EDFFATYICQ ANIFPLTFGG GTRVEIK
 GL DIQNTQSPSS VSASVGRVIT ITCRASQPI SMLAWYQRP GKAPKLIYA ASGLQGVPR FSGSGSGTD FTLTISSLPQ EDFFATYICQ ANSEFLTFGG GTRVEIK

Fig. 1D

Línea germinal: V=3-30+, D=D4+DIR3, J=JH6

3.1.1 QVQLVESGGG VVQGRSRL SCAASGFTS SYGMHWVRA PKRGLEWAV ISKDGNKYH ADSVKGRFTI SRDSKNALY LQMNSLRVED TAVYICARRG KDLWLGYYI NGLQWVGQGT TVTVSS
 GL QVQLVESGGG VVQGRSRL SCAASGFTS SYGMHWVRA PKRGLEWAV ISYDGSKYY ADSVKGRFTI SRDSKNTLY LQMNSLRVED TAVYICAR-G KDL-LGLYYI YGMDVWGQGT TVTVSS

Fig. 1E

Línea germinal: V=3-30+, D=DIR5+D1-26, J=JH6

7.1.2 QVQLVESGGG VVQGRSRL SCAASGFTS SYGMHWVRA PKRGLEWAV ISNDGNKYH ADSVKGRFTI SRDSKREFTLY LQMNSLRVED TAVYICARRG MGSSGSRGDY YYYYGLDVMG QGTTVTIVSS
 GL QVQLVESGGG VVQGRSRL SCAASGFTS SYGMHWVRA PKRGLEWAV ISYDGSKYY ADSVKGRFTI SRDSKREFTLY LQMNSLRVED TAVYICAR-- MGSSGS--DY YYYYGHDMVG QGTTVTIVSS

Fig. 1F

Línea germinal: V=4.35, D=DIR3, J=JH6

10.8.3 QVQLESGFG LVPSETLSL TCTVSGGSIS SYTHWIRQP AGRGLEWIGR VYTSGSTNYN PSLKSRVTHS VDTSKNQFSL KLSSVTRADT AVYICARDGL YRG---YGM DVWGQGTIVTVSS
 GL QVQLQESGFG LVPSETLSL TCTVSGGSIS SYTHWIRQP AGRGLEWIGR IYTSGSTNYN PSLKSRVTHS VDTSKNQFSL KLSSVTRADT AVYICAR--- YCGYIYYIGM DVWGQGTIVTVSS

Fig. 1G

Línea germinal: V=4-59, D=D4-23, J=JH4

15.1.1 QVQLESGFG LVPSETLSL TCTVSGGSIR SYTHWIRQP PKRGLEWIGY IYYSGSTNYN PSLKSRVTIS VMSKNQFSL KLSSVTRADT AVYICARRGD YGGRFMYFHQ WGQGTIVTVSS
 GL QVQLQESGFG LVPSETLSL TCTVSGGSIS SYTHWIRQP PKRGLEWIGY IYYSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTRADT AVYICAR--D YGGNS--YEDY WGQGTIVTVSS

Fig. 1H

Línea germinal: V=1-02, D=DLR1, J=JH4

21.4.1 QVQLVQSGAE VKRFGASVKV SCKASGTYFT GYMHWVRA PGQGLEWGW INPDGGTNY AQKEQGRVTH TRDTSISTAY HELNRLRSD TAVYICARDQ FLGKYNGVC SYEDYWGQGT LVTVSS
 GL QVQLVQSGAE VKRFGASVKV SCKASGTYFT GYMHWVRA PGQGLEWGW INPNSGGTNY AQKEQGRVTH TRDTSISTAY MELSLRSD TAVYICAR-- --GYCTNGVC YFEDYWGQGT LVTVSS

Fig. 2 - Alineamiento de secuencias de proteínas de dominio variable de anticuerpos con secuencias de la línea germinal (LG) (las CDR se indican subrayadas; las mutaciones de la germinal se indican en negra/sombreadas)

Fig. 2A

Línea germinal V=A3/A19, J=JK1
 22.1.1 DIVMTQSPISLSPVTEGEPASISCRSSQSLIYNGYNYLDMYLQKPGQSPHLLIYLGSRASGVPDRFSGSGSTDFTLTKISRVEAEDEVGYVYCMQALQTPRTFGQGTKEIK
 23.5.1 DIVMTQSPISLSPVTEGEPASISCRSSQSLIYNGYNYLDMYLQKPGQSPHLLIYLGSRASGVPDRFSGSGSTDFTLTKISRVEAEDEVGYVYCMQALQTPRTFGQGTKEIK
 23.29.1 DIVMTQSPISLSPVTEGEPASISCRSSQSLIYNGYNYLDMYLQKPGQSPHLLIYLGSRASGVPDRFSGSGSTDFTLTKISRVEAEDEVGYVYCMQALQTPRTFGQGTKEIK
 Germ DIVMTQSPISLSPVTEGEPASISCRSSQSLIYNGYNYLDMYLQKPGQSPHLLIYLGSRASGVPDRFSGSGSTDFTLTKISRVEAEDEVGYVYCMQALQTPRTFGQGTKEIK

Fig. 2B

Línea germinal V=A3/A19, J=JK3
 22.1.1 DIVMTQSPISLSPVTEGEPASISCRSSQSLIYNGYNYLDMYLQKPGQSPHLLIYLGSRASGVPDRFSGSGSTDFTLTKISRVEAEDEVGYVYCMQALQTPRTFGQGTKEIK
 Germ DIVMTQSPISLSPVTEGEPASISCRSSQSLIYNGYNYLDMYLQKPGQSPHLLIYLGSRASGVPDRFSGSGSTDFTLTKISRVEAEDEVGYVYCMQALQTPRTFGQGTKEIK

Fig. 2C

Línea germinal V=A27, J=JK3
 22.1.1 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSDLAWHQKPGQAPRLLIYGASRRATGIPDRFSGSGSTDFTLTKISRLEPEDFAVYVYQHRCS-LETFPGGTRKVDIK
 23.28.1 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSDLAWHQKPGQAPRLLIYGASRRATGIPDRFSGSGSTDFTLTKISRLEPEDFAVYVYQHRCS-LETFPGGTRKVDIK
 24.2.1 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSDLAWHQKPGQAPRLLIYGASRRATGIPDRFSGSGSTDFTLTKISRLEPEDFAVYVYQHRCS-LETFPGGTRKVDIK
 Germ EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSDLAWHQKPGQAPRLLIYGASRRATGIPDRFSGSGSTDFTLTKISRLEPEDFAVYVYQHRCS-LETFPGGTRKVDIK

Fig. 2D

Línea germinal V=3-30+, D=DIR3+D6-19, J=JH4
 22.1.1 QVQLVESGQVQPGERSLRLSCAASGFTFSYVMHWVROAEGKLEWVAIVMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYIQNSLRAEDTAVYVYCAR-DGGK----AVPGEYMGQGLVTVSS
 Germ QVQLVESGQVQPGERSLRLSCAASGFTFSYVMHWVROAEGKLEWVAIVMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYIQNSLRAEDTAVYVYCAR-DGGK----AVPGEYMGQGLVTVSS

Fig. 2E

Línea germinal V=3-30+, D=D1-1, J=JH6
 22.1.1 QVQLVESGQVQPGERSLRLSCAASGFTFSYVMHWVROAEGKLEWVAIVMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYIQNSLRAEDTAVYVYCAR-DGGK----AVPGEYMGQGLVTVSS
 23.1.1H-C109A QVQLVESGQVQPGERSLRLSCAASGFTFSYVMHWVROAEGKLEWVAIVMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYIQNSLRAEDTAVYVYCAR-DGGK----AVPGEYMGQGLVTVSS
 Germ QVQLVESGQVQPGERSLRLSCAASGFTFSYVMHWVROAEGKLEWVAIVMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYIQNSLRAEDTAVYVYCAR-DGGK----AVPGEYMGQGLVTVSS

Fig. 2F

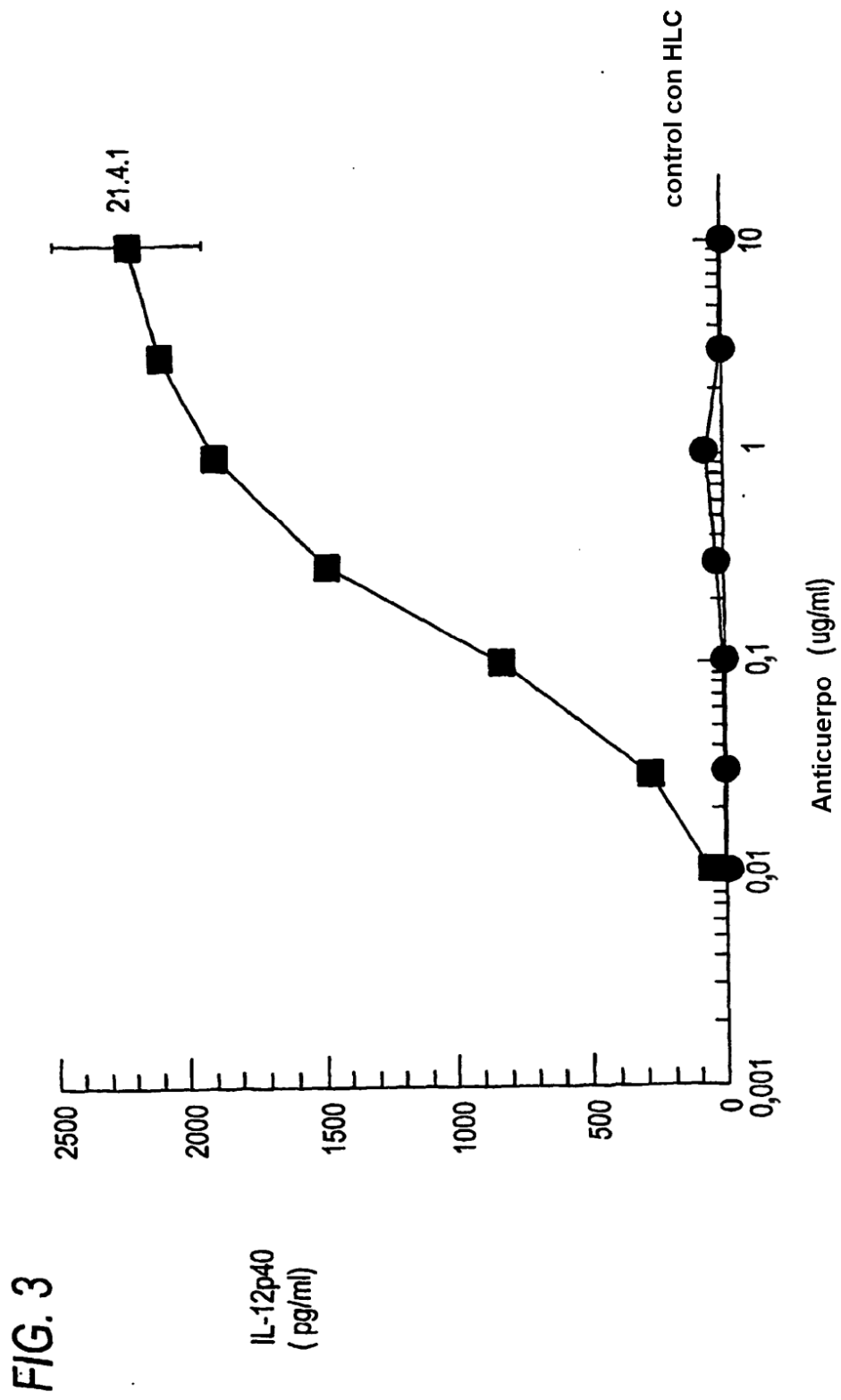
Línea germinal V=3-30+, D=D4-17, J=JH6
 23.5.1 QVQLVESGQVQPGERSLRLSCAASGFTFSYVMHWVROAEGKLEWVAIVMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYIQNSLRAEDTAVYVYCAR-DGGK----AVPGEYMGQGLVTVSS
 Germ QVQLVESGQVQPGERSLRLSCAASGFTFSYVMHWVROAEGKLEWVAIVMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYIQNSLRAEDTAVYVYCAR-DGGK----AVPGEYMGQGLVTVSS

Fig. 2G

Figura 2G
 23.28.1 QVQLVESGQVQPGERSLRLSCAASGFTFSYVMHWVROAEGKLEWVAIVMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYIQNSLRAEDTAVYVYCAR-DGGK----AVPGEYMGQGLVTVSS
 Germ QVQLVESGQVQPGERSLRLSCAASGFTFSYVMHWVROAEGKLEWVAIVMSYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYIQNSLRAEDTAVYVYCAR-DGGK----AVPGEYMGQGLVTVSS

Fig. 2H

Línea germinal V=4-16, D=DIR1+D4-17, J=JH5
 23.28.1 QVQLQESGGFLVFRPDSLTLSCTVSQGSIRGYTWKHWIRQPPGKLEWIGYIYYSGSTWYVNSPLSKSRVTSVDTSKNQPSLKLNSVTAADTAVYVYCARRGGELYGDFWFAFPGQGLVTVSS
 23.28.1H-D16E QVQLQESGGFLVFRPDSLTLSCTVSQGSIRGYTWKHWIRQPPGKLEWIGYIYYSGSTWYVNSPLSKSRVTSVDTSKNQPSLKLNSVTAADTAVYVYCARRGGELYGDFWFAFPGQGLVTVSS
 24.2.1 QVQLQESGGFLVFRPDSLTLSCTVSQGSIRGYTWKHWIRQPPGKLEWIGYIYYSGSTWYVNSPLSKSRVTSVDTSKNQPSLKLNSVTAADTAVYVYCARRGGELYGDFWFAFPGQGLVTVSS
 Germ QVQLQESGGFLVFRPDSLTLSCTVSQGSIRGYTWKHWIRQPPGKLEWIGYIYYSGSTWYVNSPLSKSRVTSVDTSKNQPSLKLNSVTAADTAVYVYCARRGGELYGDFWFAFPGQGLVTVSS



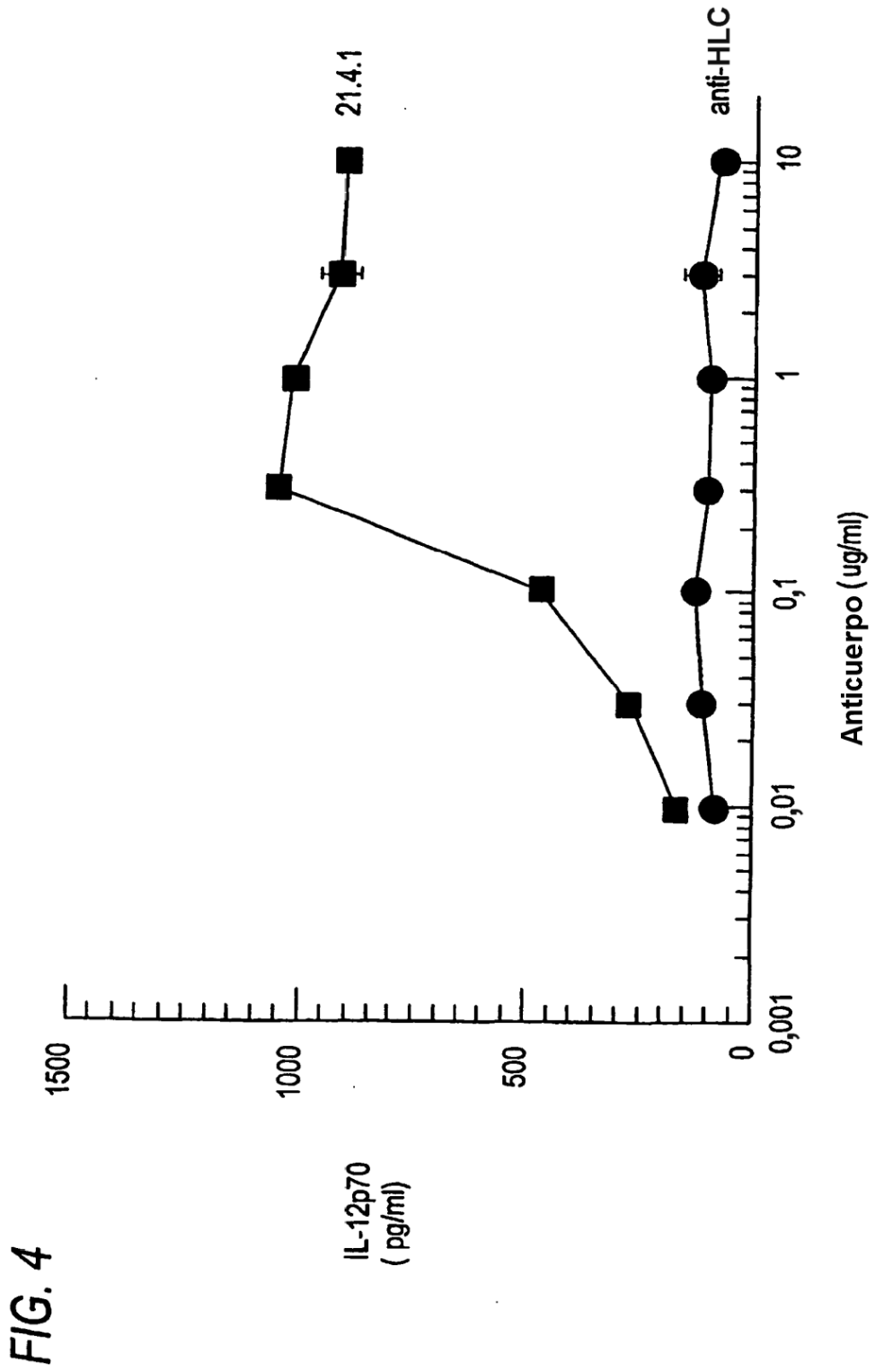
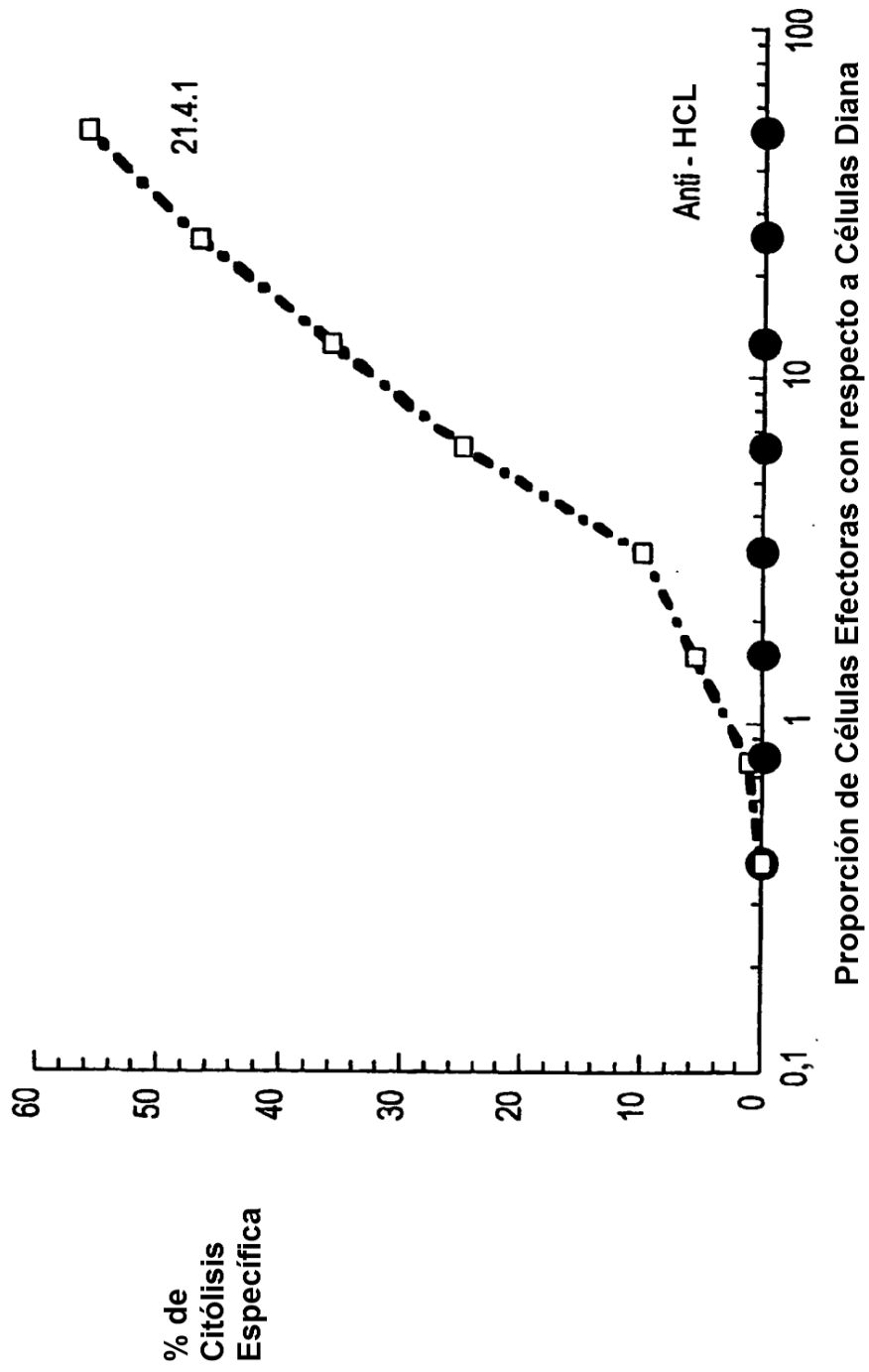
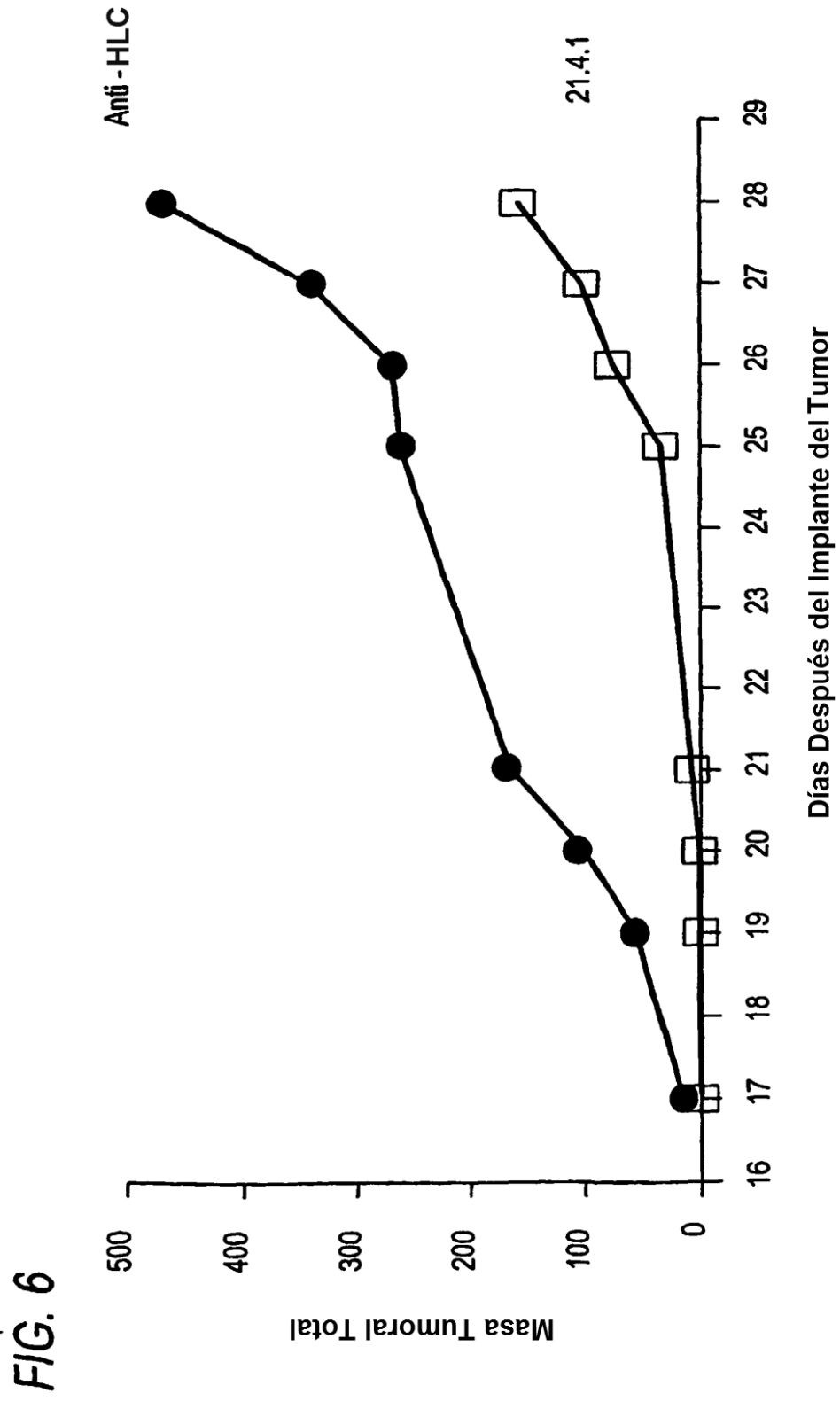


FIG. 5





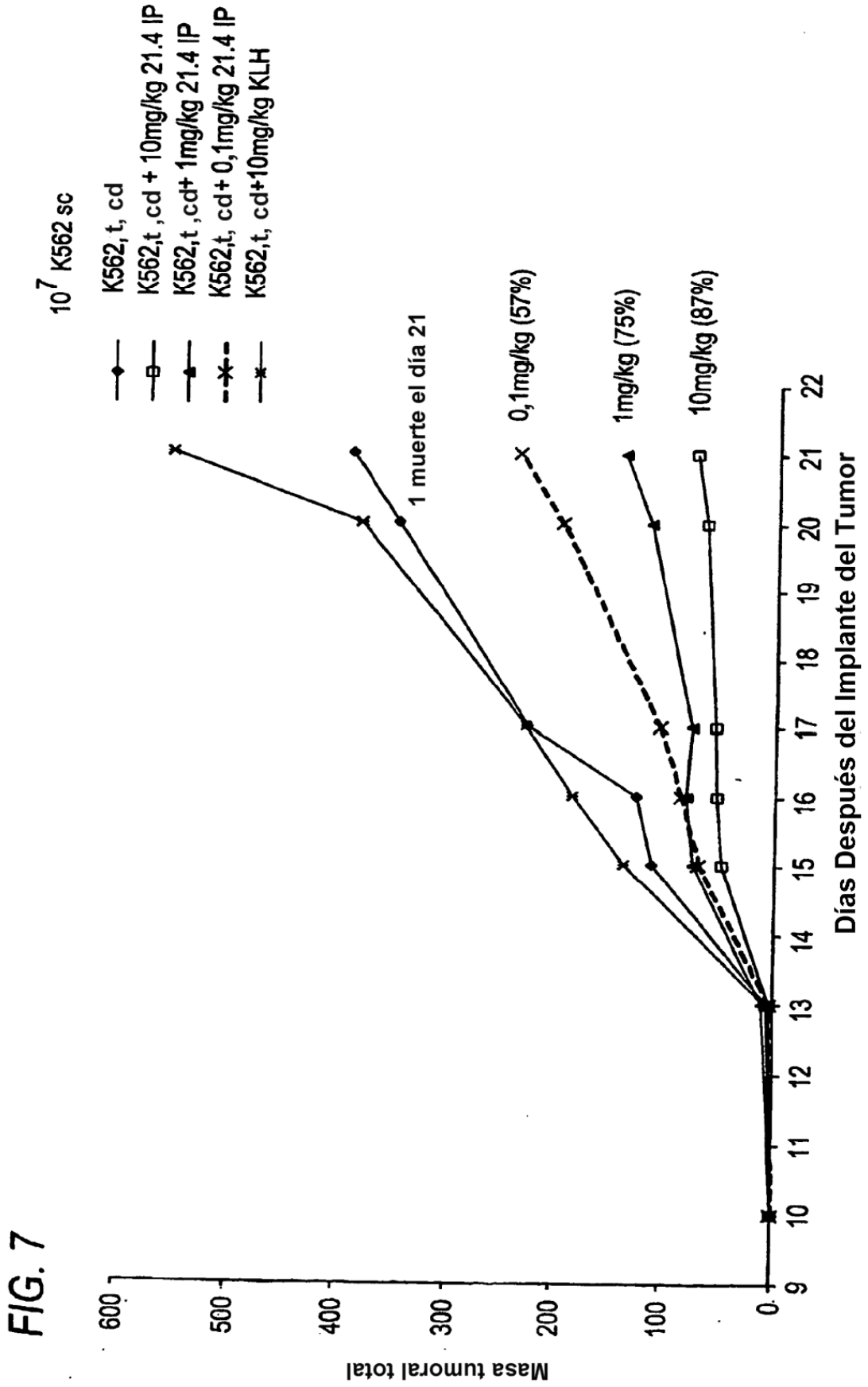


FIG. 8

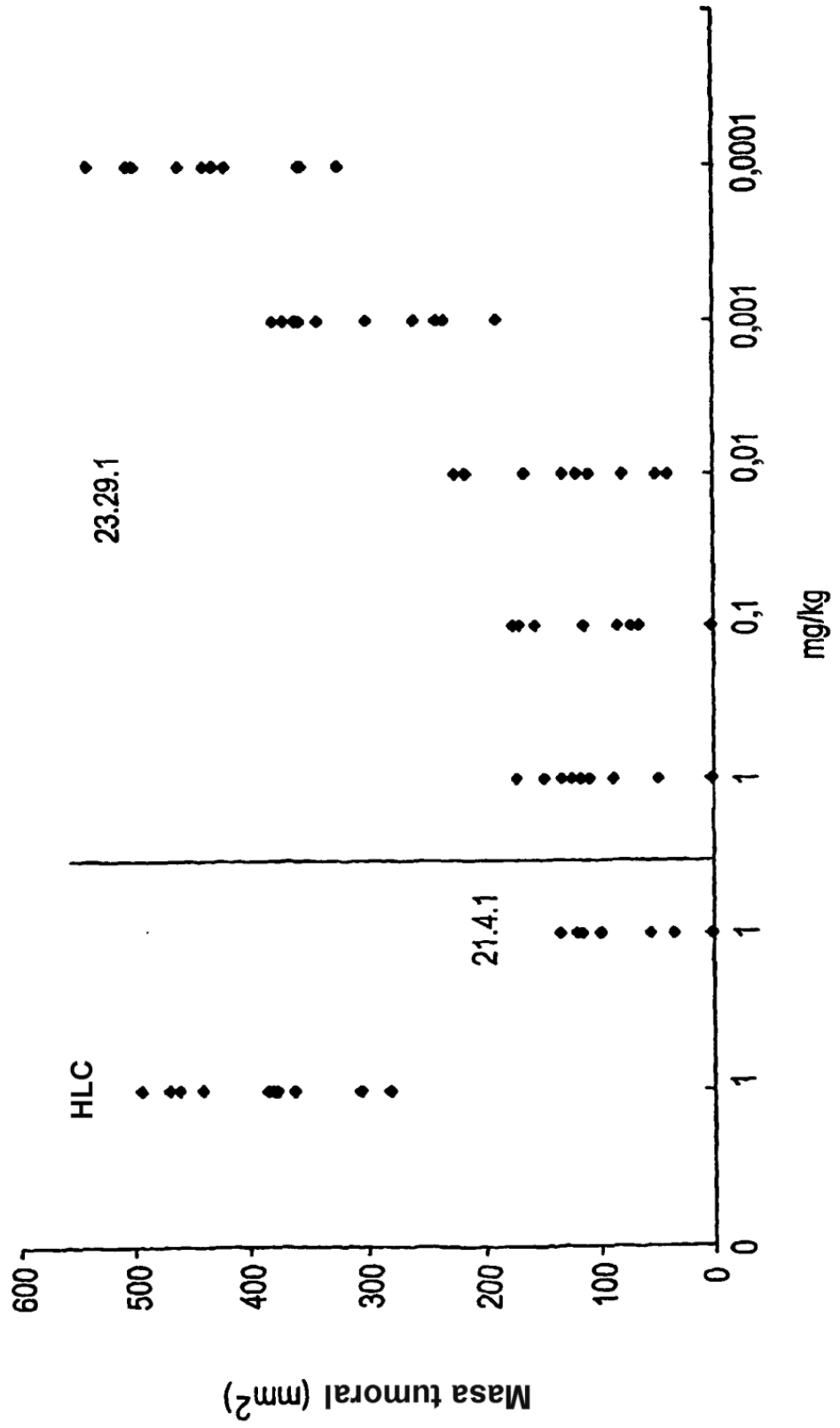


FIG. 9

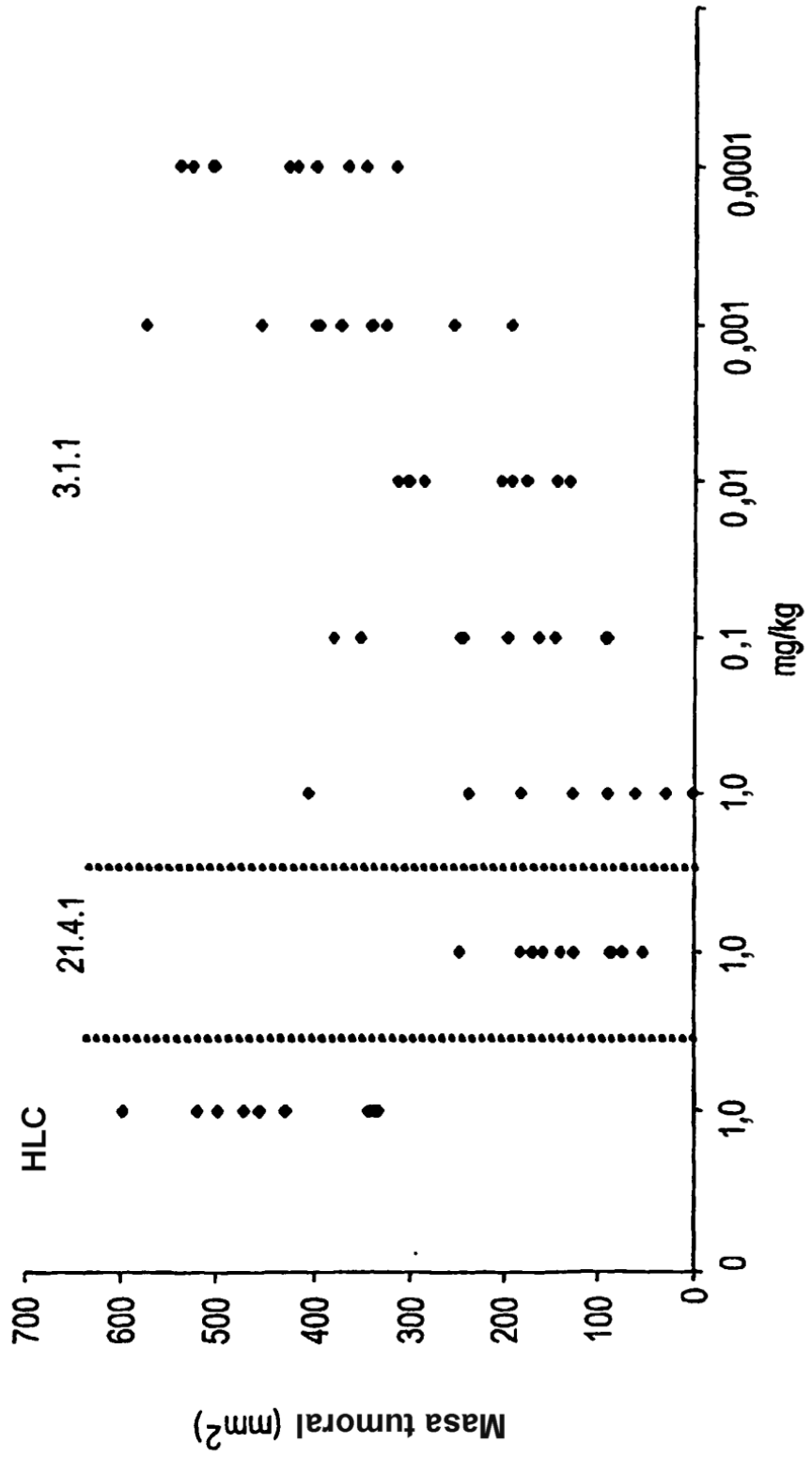


FIG. 10

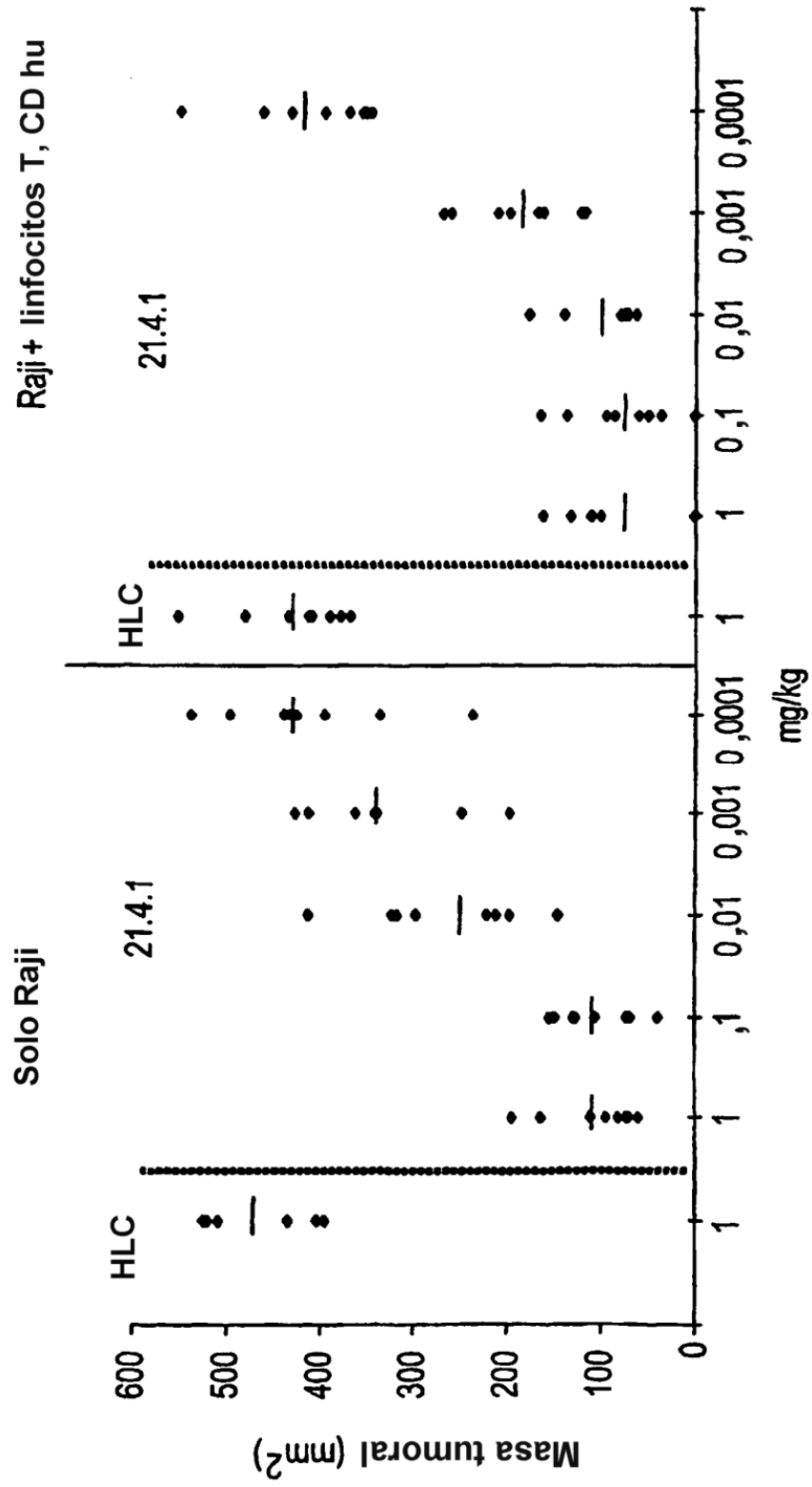
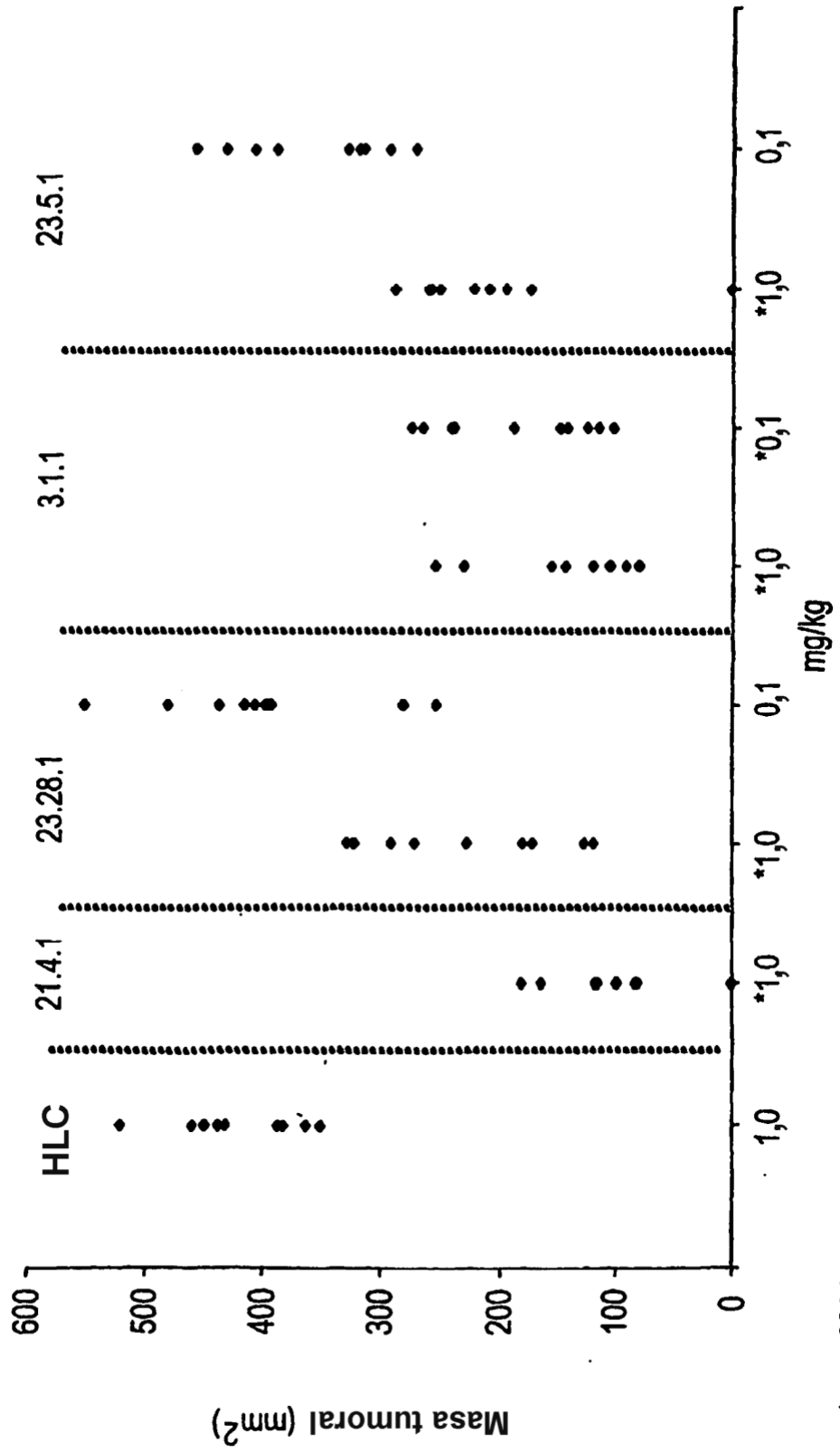


FIG. 11



* p < .0001

FIG. 12

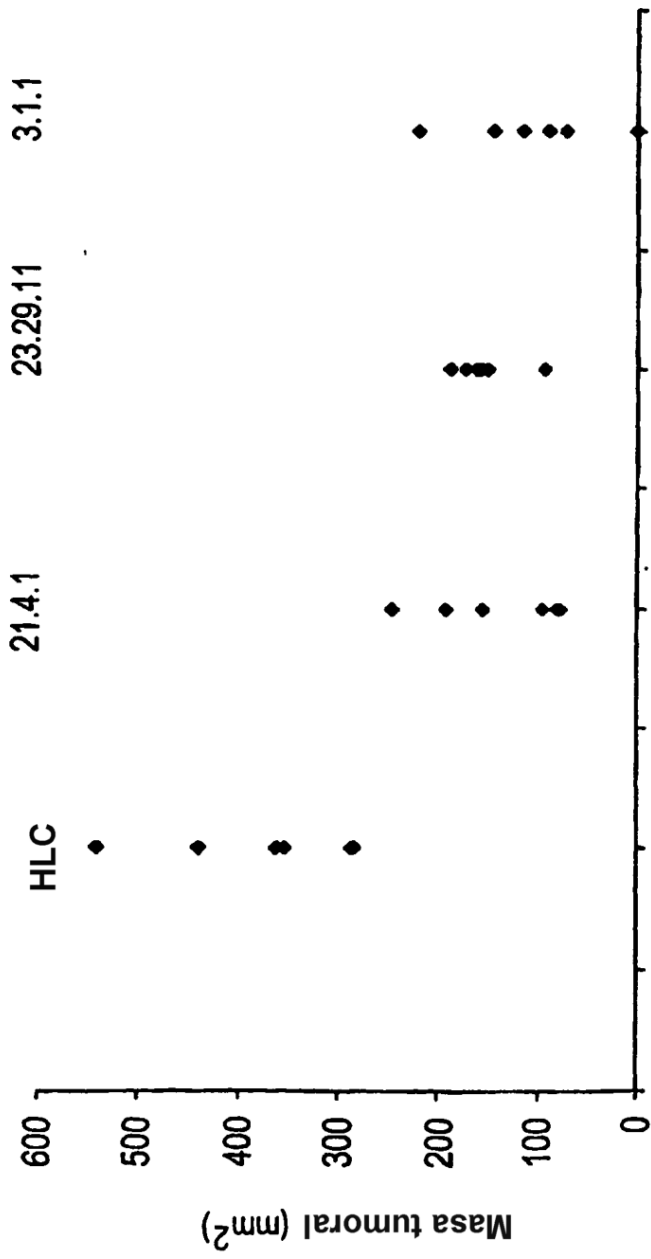


FIG. 13

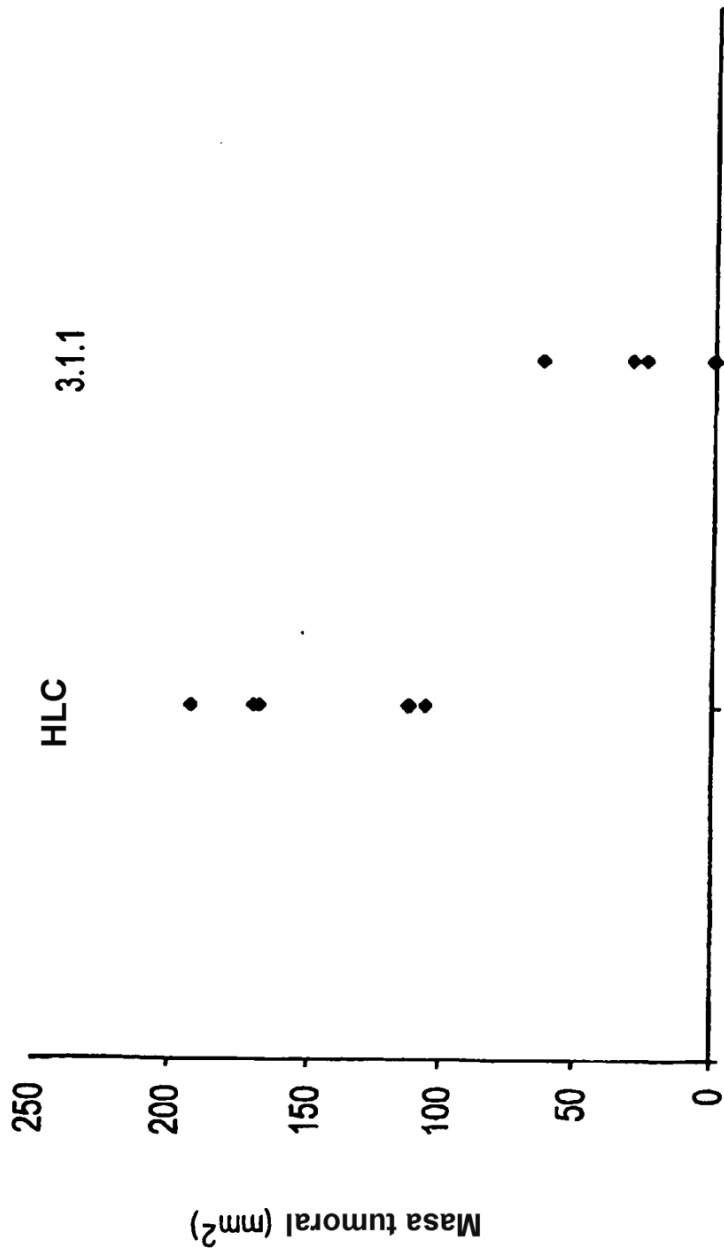


FIG. 14

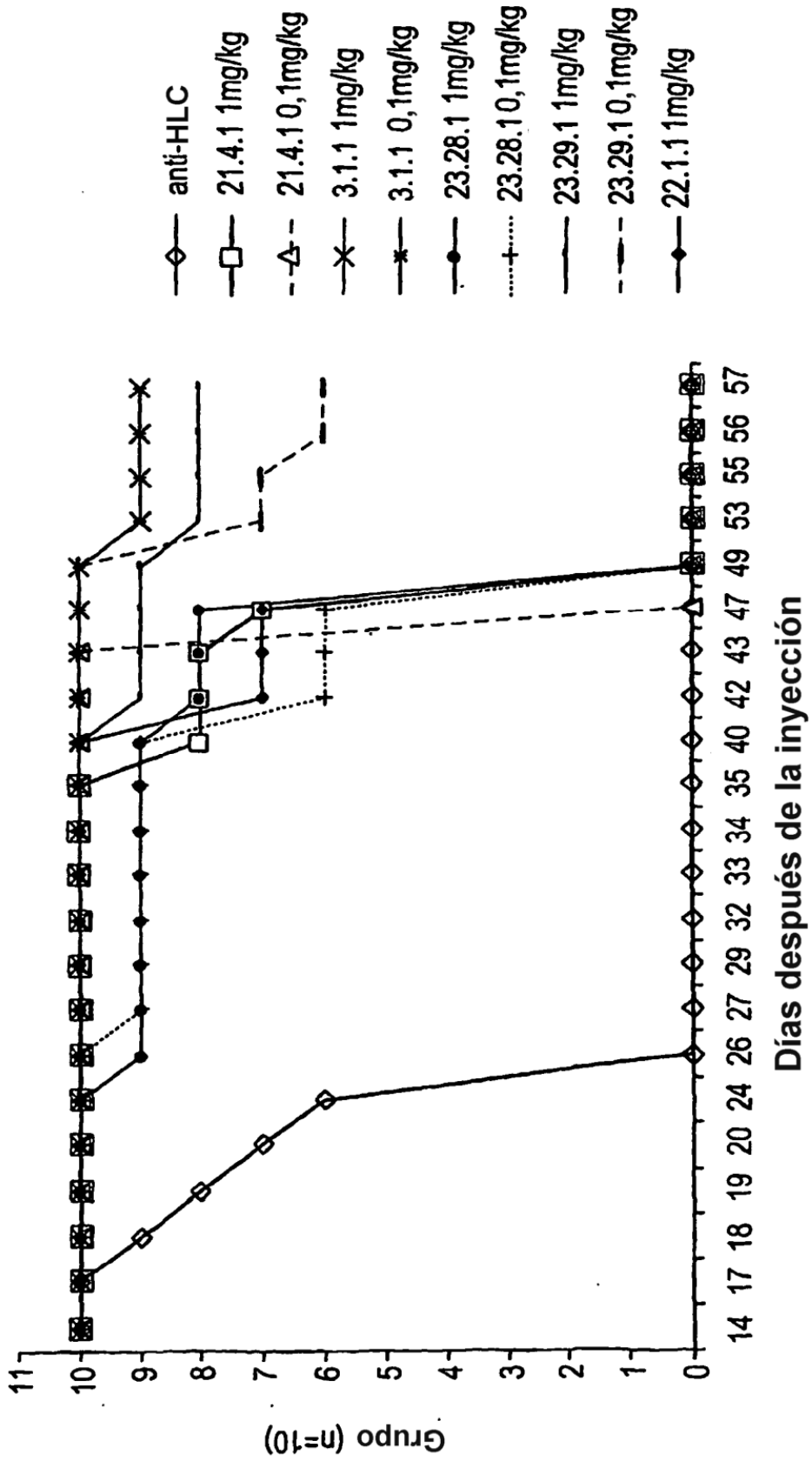


FIG. 15

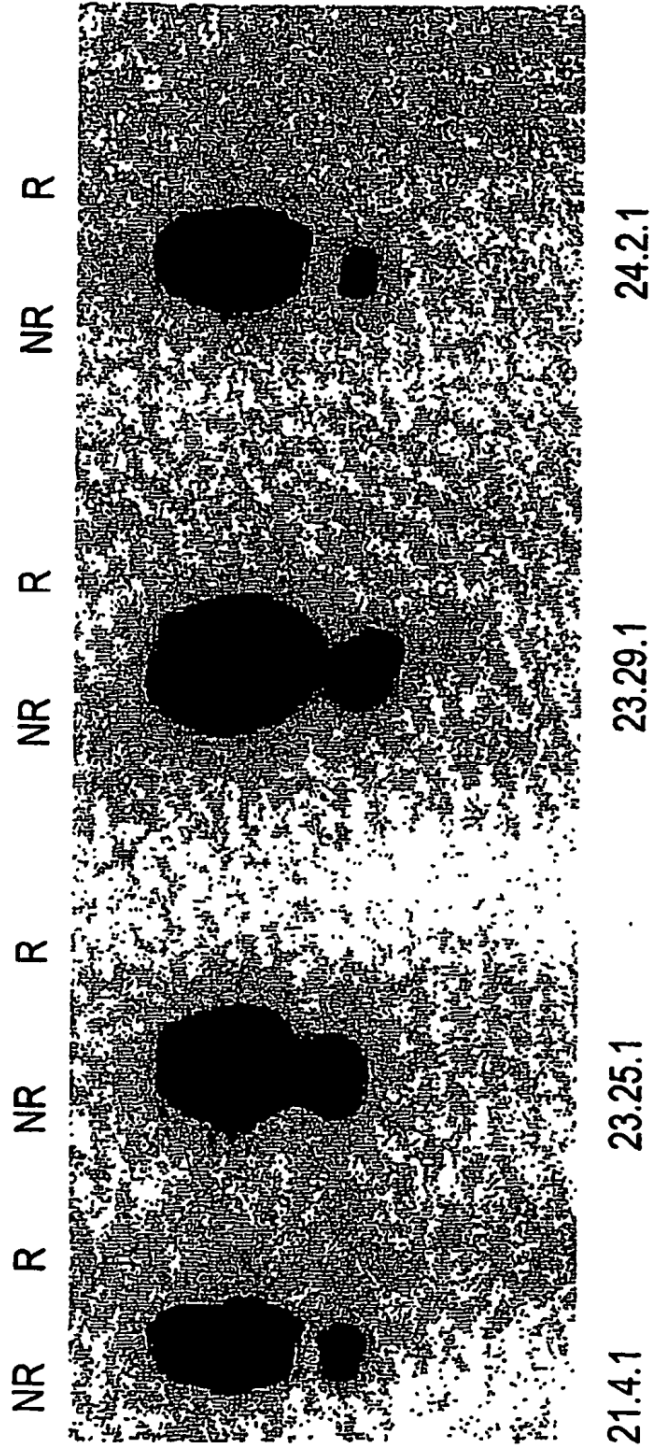


FIG. 16

	D1	
Ratón	VTCSDKQYLHDGQCCDLCQPGSRLTSHCTALEKTQCH	
Humano	TACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTEFECL	
	D2	
Ratón	PCDSGEFSAQWNREIRCHQHRHCEPNQGLRVKKEGTAESD TVCT	
Humano	PCGESEFLDTWNRETHCHQHKEYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICT	
	D3	
Ratón	CKEGQHCTSKDCEACAQHTPCI PGFGVMEMATETTDTVCHP	
Humano	CEEGWHCTSEACESVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEP	
	D4	
Ratón	CPVGFSSNQSSLFEKCYPWTSCEKNLEVLQKGT SQTNVICG	
Humano	CPVGFSSNVSSAFEKCHPWTSCE TKDLVVQQA G TNKTDVVCG	

FIG. 17

Ratón	MVSLPRLCALWGCLLTAVHLGQCVTCSQDKQYLHDGQCCDLCQPGSRLTSH
Humano	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSD
Ratón	ALEKTQCHPCDSGE FSAQWNREIRCHQHRHCEPNQGLRVKKEGT AESD
Humano	EFTETECLPCGESE FLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGT SETD
	<i>EcoRI</i>
	<i>BanI</i>
Ratón	TVCTCKEGQHCTSKDCEACAQHTPCI PGFGVMEMATETTDTVCHPCPHHHH
Humano	TICTCEEGWHCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPHHHH

FIG. 18

