

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 491 265**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2002 E 08017499 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 2009027**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal anti-CD40**

30 Prioridad:

27.04.2001 WO PCT/US01/13672
11.05.2001 JP 2001142482
05.10.2001 JP 2001310535
26.10.2001 US 40244
27.04.2001 US 844684

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

05.09.2014

73 Titular/es:

KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. (50.0%)
1-6-1, Ohtemachi, Chiyoda-ku
Tokyo, JP y
LA JOLLA INSTITUTE FOR ALLERGY AND
IMMUNOLOGY (50.0%)

72 Inventor/es:

MIKAYAMA, TOSHIFUMI;
YOSHIDA, HITOSHI;
FORCE, WALKER R.;
CHEN, XINGJIE;
TAKASHI, NOBUAKI y
SCHOENBERGER, STEPHEN P

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 491 265 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo monoclonal anti-CD40

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo que reconoce un antígeno CD40 humano presente sobre la superficie de células dendríticas (DC), células B humanas, y similares. Específicamente, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-CD40 humano o un fragmento funcional del mismo que es sustancialmente antagonista frente a un antígeno CD40 humano sobre la superficie de células dendríticas (DC), y a un anticuerpo anti-CD40 humano agonista o un fragmento funcional del mismo que se espera que tenga un efecto terapéutico mayor que los de anticuerpos anti-CD40 humano convencionales.

15 **Antecedentes de la técnica**

1. CD40

CD40 es un antígeno con un peso molecular de 50 kDa que está presente en la superficie de membranas celulares. CD40 se expresa sobre células B, células dendríticas (DC), determinados tipos de células cancerosas y células epiteliales tímicas. Se sabe que CD40 desempeña un papel clave en la proliferación y diferenciación de células B y DC. Se ha identificado CD40 como antígeno que se expresa en la superficie de células B humanas (E. A. Clark *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4494, 1986, 1. Stamenkovic *et al.*, EMBO J. 8:1403, 1989). Basándose en la homología de secuencia de aminoácidos, se cree que CD40 es un miembro de la familia de receptores de TNF, a la que pertenecen un receptor de NGF de baja afinidad, receptor de TNF, CD27, OX40, CD30 y similares. El gen de un ligando (CD40L) para CD40 humano y de ratón se ha clonado recientemente, revelando que es una proteína de membrana de tipo II, y se expresa en células T CD4+ activadas. Se ha mostrado también que CD40L introduce señales de activación fuertes en células B humanas y de ratón.

La expresión de CD40 se ha confirmado más a menudo en células dendríticas que en células B, de modo que ha quedado claro que CD40 desempeña un papel importante. La unión de CD40 con CD40L provoca la activación de células presentadoras de antígeno (APC). Específicamente, potencia la expresión de moléculas de coestimulación tales como CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2), o la producción de IL-12 (Caux, C., *et al.*: Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. J. Exp. Med., 180:1263, 1994), (Shu, U., *et al.*: Activated T cells induce interleukin-12 production by monocyte via CD40-CD40 ligand interaction. Eur. J. Immunol. 25: 1125, 1995). Las células dendríticas muestran una fuerte capacidad de presentación de antígenos, y tienen una fuerte capacidad de activación de células T auxiliares (Th). Además, se cree que las células dendríticas controlan la diferenciación de células Th vírgenes en células Th1 o Th2. Cuando se hace que las células dendríticas (DC1) maduren cultivando monocitos de sangre periférica que son células dendríticas mieloides en presencia de GM-CSF e IL-4 y usando CD40L, las DC1 *in vitro* pueden producir IL-12, estimular y activar células Th alovírgenes, y por tanto inducen células T que producen IFN γ (específicamente, promueven la diferenciación en Th1). Puesto que esta acción se inhibe por anticuerpos anti-IL-12, la reacción puede estar mediada por IL-12. Por otro lado, cuando se preparan linfocitos-células dendríticas (DC2) cultivando regiones T de tejido linfático o células T plasmacitoides presentes en sangre periférica con IL-3 y ligandos de CD40, las DC2 no pueden producir IL-12, estimular ni activar células Th alovírgenes, inducen células T que producen IL-4 y por tanto promueven la diferenciación en Th2. Se cree que las células Th1 están implicadas en la activación de inmunidad celular, y las células Th2 están implicadas en la potenciación de la capacidad para inmunidad humoral así como la supresión de la capacidad para inmunidad celular. Células T citotóxicas (CTL) activadas con la ayuda de células Th1 pueden eliminar factores causantes (muchos virus, *Listeria monocytogenes*, bacilo de la tuberculosis, protozoos toxoplasma y similares) que se multiplican en el citoplasma y células tumorales.

Se ha mostrado que anticuerpos monoclonales anti-CD40 que reconocen CD40 expresado sobre las superficies de membranas ejercen una variedad de actividades biológicas en células B. Los anticuerpos monoclonales anti-CD40 se clasifican en gran medida en anticuerpos agonistas y antagonistas que tienen un impacto en la interacción entre CD40 y CD40L.

55 2. Anticuerpo agonista

Se conoce la activación de células B como una acción de anticuerpos agonistas. Por ejemplo, se ha notificado que anticuerpos anti-CD40 inducen adhesión celular (Barrett *et al.*, J. Immunol. 146: 1722, 1991; Gordon *et al.*, J. Immunol. 140: 1425, 1988), potencian el tamaño celular (Gordon *et al.*, J. Immunol. 140: 1425, 1988; Valle *et al.*, Eur. J. Immunol. 19: 1463, 1989), inducen la división de células B que se activan sólo con anticuerpos anti-IgM, anticuerpos anti-CD20 o éster de forbol (Clark y Ledbetter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4494, 1986; Gordon *et al.*, LEUCOCYTE TYPING III. A. J. McMichael ed. Oxford University Press. Oxford, p. 426; Paulie *et al.*, J. Immunol. 142: 590, 1989), inducen la división de células B en presencia de IL4 (Valle *et al.*, Eur. J. Immunol. 19: 1463, 1989; Gordon *et al.*, Eur. J. Immunol. 17: 1535, 1987), inducen la expresión de IgE (Jabara *et al.*, J. Exp. Med. 172: 1861, 1990; Gascan *et al.*, J. Immunol. 147: 8, 1991), IgG e IgM (Gascan *et al.*, J. Immunol. 147: 8, 1991) de células estimuladas con IL-4 y cultivadas sin células T, potencian la secreción y la expresión sobre la célula (Challa A,

Allergy, 54: 576, 1999) de Fcε RII/CD23 soluble a partir de células B mediante IL-4 (Gordon y Guy, Immunol. Today 8: 339, 1987; Cairns *et al.*, Eur. J. Immunol. 18: 349, 1988) y promueven la producción de IL-6 (Clark y Shu, J. Immunol. 145: 1400, 1990). Además, se ha notificado que se establecen clones de células B a partir de células B en cultivo primario humanas añadiendo IL-4 y anticuerpos anti-CD40 en presencia de células de adhesión CDw32+ (Bancherau *et al.*, Science 241:70,1991), y la inhibición de la apoptosis de células centrales germinales está mediada por CD40, independientemente de la función de receptores de antígenos (Liu *et al.*, Nature 342: 929,1989). Tal como se describió anteriormente, se ha identificado CD40 como un antígeno expresado en la superficie de células B humanas. Por tanto, la mayoría de los anticuerpos aislados se han evaluado principalmente usando la función para inducir la proliferación y diferenciación de células B humanas y la actividad para inducir muerte celular en células cancerosas como indicadores (Katira, A. *et al.*, LEUKOCYTE TYPING V. S. F. Schlossossmann, *et al.* eds. p. 547. Oxford University Press. Oxford, W. C. Flansow *et al.*, LEUKOCYTE TYPING V. S. F. Schlossossmann, *et al.* eds. p. 555. Oxford University Press. Oxford, J. D. Pound *et al.*, International Immunology, 11: 11, 1999).

Se mostró que anticuerpos anti-CD40 provocan la maduración de DC (Z. H. Zhou *et al.*, Hybridoma, 18: 471 1999). Además, se ha notificado el papel de células CD4T en la sensibilización de células T CD8 específicas de antígeno para activar DC por medio de señalización por CD40-CD40L. Se mostró que el papel de células T auxiliares CD4 en la activación de células dendríticas (DC) puede reemplazarse por el de anticuerpos monoclonales (AcM) anti-CD40 (Shoenberger, S.P., *et al.*: T cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. Nature, 480, 1998). Además, se mostró en ratones que el organismo puede protegerse no sólo de células tumorales que expresan CD40 sino también de células tumorales que no expresan el mismo mediante la administración de anticuerpos anti-CD40 (French, R. R., *et al.*: CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help. Nature Medicine, 5, 1999).

La mayoría de los anticuerpos notificados hasta la fecha no se han aislado usando el efecto sobre DC como indicador. Sin embargo, en cuanto a la modificación de las funciones de DC, es probable que anticuerpos seleccionados por su acción sobre células B sean insuficientes como agentes terapéuticos. Se notificó que entre anticuerpos monoclonales contra CD40 de ratón, hay clones que reaccionan frente a DC, pero no reaccionan frente a células endoteliales vasculares y, a la inversa, clones que no reaccionan frente a DC, pero reaccionan frente a células endoteliales vasculares, dependiendo de los epítomos que reconocen los anticuerpos (Van Den Berg, TK, *et al.*, Immunology, 88: 294, 1996). Se supone también que la unión y acción de anticuerpos frente a CD40 humanos a DC difieren dependiendo de los epítomos.

Se sabe que anticuerpos anti-CD40 o ligandos de CD40 pueden suprimir la proliferación de líneas celulares de linfoma que expresan CD40 y por tanto pueden inducir la muerte celular (Funakoshi S *et al.*, Blood, 83: 2782, 1994; Funakoshi S *et al.*, Journal of Immunotherapy, 19, 93, 1996; Z. H. Zhou *et al.*, Hybridoma, 18: 471 1999; y Joseph A *et al.*, Cancer Research, 60: 3225, 2000). Lo que es interesante sobre los anticuerpos agonistas es que la función del anticuerpo no siempre coincide siempre con la de CD40L. La acción de activar células B tampoco coincide con la acción de suprimir el crecimiento tumoral de células B. Se desea desarrollar anticuerpos que tengan tanto capacidad de activación de DC como acción de supresión de la proliferación de células tumorales. Además, entre los anticuerpos agonistas, están presentes tanto anticuerpos que inhiben como los que no inhiben la unión de CD40L a CD40 (Challa A *et al.*, Allergy, 54: 576, 1999). Por ejemplo, anticuerpos producidos por G28-5 (N.º de la ATCC HB-9110) compiten con CD40L, de modo que no hay ningún efecto resultante del uso combinado con CD40L. El grado de activación de células que expresan CD40 difiere dependiendo de los anticuerpos. Incluso cuando los anticuerpos presentan actividad agonista débil independientemente, el uso combinado de los anticuerpos con ligandos de CD40 puede promover más significativamente la actividad en presencia de los anticuerpos, que la actividad resultante de ligandos de CD40 solos. En contraposición, incluso cuando los anticuerpos presentan actividad agonista independientemente, la inhibición de ligandos de CD40 puede disminuir la actividad en presencia de los anticuerpos en un mayor grado que la actividad resultante de ligandos de CD40 solos (Pound *et al.*, International Immunology, 11:11, 1999). Se mostró que con anticuerpos que no compiten con ligandos de CD40, puede lograrse una supresión más fuerte de la proliferación en presencia de ligandos de CD40, aunque la acción de supresión de la proliferación de células tumorales del propio anticuerpo sea débil (Joseph A *et al.*, Cancer Research, 60: 3225, 2000). Por consiguiente, se desea desarrollar anticuerpos que se unen a CD40 para suprimir la proliferación celular independientemente, pero que no inhiban la unión de ligandos de CD40 a CD40. Aprovechando plenamente tales características, hay una posibilidad de desarrollar un agente terapéutico que sea más eficaz que un CD40L soluble. Por ejemplo, el CD40L soluble se activa mediante la unión con CD40, y al mismo tiempo, suprime la función de CD40L presente *in vivo*. Un anticuerpo que no compite con CD40L no provoca tal supresión, y puede esperarse que tenga mejores efectos terapéuticos por el efecto sinérgico.

3. Anticuerpo antagonista

Mientras tanto, tal como se describió anteriormente, se espera que debido a que CD40 desempeña un papel importante en la reacción inmunitaria, puedan desarrollarse agentes terapéuticos para supresión inmunitaria tras trasplante de órganos y contra enfermedad autoinmunitaria inhibiendo la unión de CD40 con su ligando. Sawada-Hase *et al.*, han notificado que la proporción de células que expresan fuertemente CD40 aumentaba en monocitos de sangre periférica de pacientes con enfermedad de Crohn. Sin embargo, los anticuerpos que inhiben la unión de CD40 con su ligando no se han entendido bien. Por ejemplo, tales anticuerpos que inhiben la unión pueden ser

eficaces para el análisis funcional de CD40, y la terapia contra una enfermedad, para la que se requiere activación de CD40. Además, también se ha mostrado que los anticuerpos que inhiben ligandos de CD40 tienen el potencial de ser eficaces como agentes contra enfermedades con las que está implicada la unión de CD40 con ligandos de CD40. Sin embargo, se ha notificado que CD40L se expresa en plaquetas sanguíneas activadas (V. Henn *et al.*, Nature 391: 591, 1998). Por tanto, se ha notificado que existe el riesgo de provocar trombos, si se usan anticuerpos anti-CD40L como agente terapéutico (T. Kawai *et al.*, Nat. Med. 6: 114, 2000). Desde un punto de vista de este tipo, puede esperarse que anticuerpos contra CD40 sean más seguros que anticuerpos anti-CD40L, como agente terapéutico de anticuerpo que inhibe la unión de CD40 con su ligando. Se requieren anticuerpos anti-CD40 para suprimir la unión de CD40L a CD40, y no activar CD40 mediante el propio anticuerpo.

Aunque se han realizado un gran número de estudios en el pasado referentes a anticuerpos que se unen específicamente a CD40 humano y suprimen la unión de CD40L a CD40 sin activar CD40, sólo se ha notificado un único caso, que es un anticuerpo de ratón anti-CD40 humano, denominado 5D12 (J. Kwekkeboom *et al.*, Immunology 79: 439, 1993). Además, no se ha sabido si los anticuerpos que muestran actividad de neutralización para células B también pueden mostrar o no la misma para DC, es decir, si los anticuerpos pueden neutralizar la acción de ligandos de CD40. Además, se ha notificado que la acción de anticuerpos biotinilados anti-CD40 de ratón se potencia mediante reticulación con avidina (Johnson *et al.*, Eur J Immunol, 24: 1835, 1994). Se potenció la acción de ligandos de CD40 solubles contra una línea de células B (células Ramos) usando anticuerpos (M2) contra etiquetas (FLAG), que se habían proporcionado previamente mediante técnicas de ingeniería genética a los ligandos solubles, y se midió la actividad de neutralización. Por tanto, se confirmó que 5D12 (N.º de la ATCC HB-11339) presenta sólo una actividad de neutralización ligera.

Se ha encontrado recientemente que 5D12, un anticuerpo antagonista, tiene actividad agonista por sí mismo, como resultado de reticulación incluso en ausencia de CD40L. Convencionalmente, se ha notificado que la acción de anticuerpos frente a CD40 de ratón se potencia mediante reticulación de biotina con avidina (Johnson *et al.*, Eur J Immunol, 24: 1835, 1994). Además, se ha sabido que el tratamiento en fase sólida de anticuerpos frente a CD40 usando anticuerpos anti-inmunoglobulina tratados en fase sólida sobre una placa conduce a un aumento en la actividad para suprimir la proliferación de células tumorales. Se ha creído que esto es un efecto que resulta del tratamiento en fase sólida. Sin embargo, no se sabía que cuando se añaden anticuerpos anti-inmunoglobulina a una disolución de cultivo para la reticulación de anticuerpos anti-CD40, pueda ser posible incluso para anticuerpos antagonistas mostrar actividad agonista. Si los anticuerpos que van a usarse para la terapia tienen antigenicidad, puede producirse un efecto completamente opuesto, de manera que se producen anticuerpos que se unen a anticuerpos frente a CD40 en un cuerpo humano, y con los que se reticulan anticuerpos frente a CD40, de modo que se produce una actividad igual que la de ligandos de CD40. Por consiguiente, en vista de la seguridad de un agente terapéutico, es muy importante mantener la antigenicidad de los anticuerpos a un bajo nivel. Considerése un caso en el que se desarrolla un agente terapéutico mediante tecnología de humanización basándose en la secuencia de una región variable de un anticuerpo de ratón. Puesto que se sabe que los anticuerpos humanizados tienen inmunogenicidad, pueden producirse anti-anticuerpos anti-CD40 humanizados tras la administración. Específicamente, puede haber un riesgo de que los anticuerpos se vuelvan anticuerpos agonistas. Incluso si la antigenicidad es baja, pueden reticularse anticuerpos anti-CD40 con receptores de anticuerpos (FcR). A partir de estos puntos, un anticuerpo antagonista preferido es un anticuerpo humano que se une específicamente a CD40, suprime la unión de CD40L y no activa CD40 incluso mediante reticulación, y presenta unión débil a FcR.

Sumario de la invención

Tal como se describió anteriormente, las funciones de DC se han analizado recientemente cada vez más, de modo que CD40 ha comenzado a reconocerse como un gen importante en el control de las funciones de DC. Partiendo de estos antecedentes, el fin de la presente invención es proporcionar mediante el empleo de un sistema de evaluación usando DC, un anticuerpo anti-CD40 humano o un fragmento funcional del mismo, que es sustancialmente antagonista también frente a un antígeno CD40 humano en la superficie de células dendríticas (DC), y un anticuerpo anti-CD40 agonista humano o un fragmento funcional del mismo que se espera que tenga un efecto terapéutico mayor que el del anticuerpo convencional anti-CD40 humano.

Como resultado de estudios intensivos referentes a la preparación de anticuerpos contra CD40 humano, se ha completado la presente invención teniendo éxito en la producción de un anticuerpo antagonista y anticuerpo agonista novedoso que se cree que tienen un efecto terapéutico contra la enfermedad mayor que el del anticuerpo anti-CD40 conocido convencionalmente. Es decir, la presente invención es tal como sigue.

[1.] Un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo que se produce mediante el hibridoma KM341-1-19 (n.º de registro FERM BP-7759).

[2.] Un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo, que tiene secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo producido mediante el hibridoma KM341-1-19 (n.º de registro FERM BP-7759).

[3.] Un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo, que tiene secuencias de aminoácidos de las porciones

5 maduras de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo producido mediante el hibridoma KM341-1-19 (n.º de registro FERM BP-7759), estando representadas la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera respectivamente por SEQ ID NO: 28 y 30.

10 [4.] Un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo, que tiene secuencias de aminoácidos de las porciones maduras de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo, estando representadas la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera respectivamente por SEQ ID NO: 28 y 30.

[5.] Un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo, que tiene secuencias de aminoácidos que oscilan respectivamente entre la 21ª Q y la 148ª S de SEQ ID NO: 28 y oscilan entre el 21º E y la 124ª K de SEQ ID NO: 30.

15 [6.] Un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo, que tiene secuencias de aminoácidos de las porciones maduras de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, estando codificadas la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera respectivamente por secuencias de ácido nucleico aisladas del hibridoma KM341-1-19 (n.º de registro FERM BP-7759).

20 [7.] Un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo, que tiene secuencias de aminoácidos que están codificadas respectivamente por secuencias de ácido nucleico que oscilan entre la 110ª C y la 493ª A de SEQ ID NO: 27 y que oscilan entre la 89ª G y la 400ª A de SEQ ID NO: 29.

25 [8.] El anticuerpo del fragmento funcional del anticuerpo de uno cualquiera de [1] a [7], que es un anticuerpo humano.

[9.] Una composición farmacéutica que contiene como principio activo el anticuerpo del fragmento funcional del anticuerpo de uno cualquiera de [1] a [8].

30 [10.] Un agente inmunopotenciador, agente antitumoral o agente anti-enfermedad autoinmunitaria, que contiene como principio activo el anticuerpo o el fragmento funcional del mismo de uno cualquiera de [1] a [8].

35 [11.] Uso del anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de uno cualquiera de [1] a [8] para la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento de pacientes que necesitan inmunopotenciación, para el tratamiento de tumores o para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

[12.] Hibridoma KM341-1-19 (n.º de registro FERM BP-7759).

40 [13.] Un ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos de la porción madura de una región variable de cadena pesada aislada a partir del hibridoma KM341-1-19 (n.º de registro FERM BP-7759), en el que la región variable de cadena pesada está codificada por una secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 27.

45 [14.] Un ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos de la porción madura de una región variable de cadena ligera aislada a partir del hibridoma KM341-1-19 (n.º de registro FERM BP-7759), en el que la región variable de cadena ligera está codificada por una secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 29.

[15.] El ácido nucleico según [13] o [14], que es ARN o ADN.

50 [16.] Un vector que comprende el ácido nucleico de [13] o [14].

[17.] Una célula huésped que comprende el vector de [16].

55 [18.] Un método de producción de un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo, que comprende cultivar la célula huésped que comprende un vector que tiene el ácido nucleico de [13] y el ácido nucleico de [14] y que expresa el anticuerpo del fragmento funcional del anticuerpo.

60 [19.] El fragmento funcional tal como se define en [2], que comprende una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo producido mediante el hibridoma KM341-1-19 (n.º de registro FERM BP-7759).

[20.] El fragmento funcional tal como se define en uno cualquiera de [3] a [5], que comprende las porciones maduras de una región variable de cadena pesada representada por SEQ ID NO: 28 o una región variable de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 30.

65 En el presente documento se dan a conocer:

(1) Un anticuerpo contra un CD40 humano, o un fragmento funcional del mismo, que tiene al menos una propiedad seleccionada de las siguientes propiedades (a) a (f) de:

(a) actuar sobre células dendríticas para producir IL-12 en presencia de LPS e IFN γ ;

(b) tener actividad para actuar sobre células dendríticas provocando que las células maduren, que es mayor que la de un anticuerpo G28-5;

(c) tener actividad para promover que una línea de células B establecida exprese CD95, que es mayor que la del anticuerpo G28-5;

(d) tener actividad para suprimir la proliferación de una línea de células B establecida, que es mayor que la del anticuerpo G28-5;

(e) inducir la muerte celular de una línea de células B establecida; y

(f) no inhibir la unión de ligandos de CD40 a CD40.

(2) El anticuerpo anterior o el fragmento funcional del mismo de la presente invención, en el que la maduración de células dendríticas se realiza a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ o menos. Además, el anticuerpo o el fragmento funcional del mismo promueve que la línea de células B establecida exprese CD95 a la concentración de anticuerpo de 20 $\mu\text{g/ml}$ o menos. Los ejemplos de la línea de células B establecida incluyen Ramos, HS-Sulton o similares.

(3) Además, el anticuerpo anterior o el fragmento funcional del mismo de la presente invención conduce a la producción de 100 pg/ml o más de IL-12 cuando se añaden los anticuerpos con una concentración de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ o más a células dendríticas con una concentración de 1×10^6 células/ml, y la producción de 1000 pg/ml o más, preferiblemente 10000 pg/ml o más de IL-12 cuando se añaden los anticuerpos con una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ o más.

(4) Además, dentro del intervalo de concentración de anticuerpo de entre 0,01 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$, el anticuerpo anterior o el fragmento funcional del mismo de la presente invención, que promueve que la línea de células B establecida (célula Ramos) exprese CD95 con una eficacia de aproximadamente 2 a 3 veces mayor o más que la expresada por un anticuerpo G28-5 como control. Por ejemplo, con una concentración de anticuerpo de 0,01 $\mu\text{g/ml}$, la expresión se promueve con una eficacia de aproximadamente 2 a 6 veces mayor o más que la expresada por el anticuerpo G28-5 como control. Con una concentración de anticuerpo de 0,1 $\mu\text{g/ml}$, la expresión se promueve con una eficacia de aproximadamente 2 a 7 veces mayor o más que la expresada por el anticuerpo G28-5 como control. Con una concentración de anticuerpo de 1 $\mu\text{g/ml}$, la expresión se promueve con una eficacia de aproximadamente 2 a 7 veces mayor o más que la expresada por el anticuerpo G28-5 como control. Con una concentración de anticuerpo de 10 $\mu\text{g/ml}$, la expresión se promueve con una eficacia de aproximadamente 2 a 6 veces mayor o más que la expresada por el anticuerpo G28-5 como control.

(5) Un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, que tiene las secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo que se produce mediante un hibridoma KM302-1 (n.º de registro: FERM BP-7578), KM341-1-19 (n.º de registro: FERM BP-7759), 2105 (n.º de registro: FERM BP-8024) o F1-102 (n.º de registro: ATCC PTA-3337).

Nombre	N.º de registro	Fecha de depósito	Depositado con:
KM302-1	FERM BP-7578	9 de mayo de 2001	International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Central 6, 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón)
KM341-1-19	FERM BP-7759	27 de septiembre de 2001	
2105	FERM BP-8024	17 de abril de 2002	
F1-102	ATCC PTA-3337	24 de abril de 2001	Colección americana de cultivos tipo (<i>American Type Culture Collection</i>) (10801 University Blvd. Manassas, Virginia, 20110-2209, EE.UU.)

(6) Un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, que tiene secuencias de aminoácidos de las porciones maduras de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera del anticuerpo producido mediante un hibridoma F2-103, que se codifican respectivamente por ADN de plásmido con n.º de registro ATCC PTA-3302 y ATCC PTA-3303; una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera del anticuerpo producido mediante un hibridoma F5-77, que se codifican respectivamente por ADN de plásmido con n.º de registro ATCC PTA-3304 y ATCC PTA-3305; o una región variable de cadena pesada y una región variable de

cadena ligera del anticuerpo producido mediante un hibridoma F5-157, que se codifican respectivamente por ADN de plásmido con n.^{os} de registro ATCC PTA-3306 y ATCC PTA-3307.

Nombre	N.º de registro	Fecha de depósito	Depositado con:
Cadena pesada de F2-103 (F2-103-H)	ATCC PTA-3302	19 de abril de 2001	Colección americana de cultivos tipo (<i>American Type Culture Collection</i>) (10801 University Blvd. Manassas, Virginia, 20110-2209, EE.UU.)
Cadena ligera de F2-103 (F2-103-L)	ATCC PTA-3303	19 de abril de 2001	
Cadena pesada de F5-77 (F5-77-H)	ATCC PTA-3304	19 de abril de 2001	
Cadena ligera de F5-77 (F5-77-L)	ATCC PTA-3305	19 de abril de 2001	
Cadena pesada de F5-157 (F5-157-H)	ATCC PTA-3306	19 de abril de 2001	
Cadena ligera de F5-157 (F5-157-L)	ATCC PTA-3307	19 de abril de 2001	

- 5 (7) Un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, que tiene secuencias de aminoácidos de las porciones maduras de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera del anticuerpo producido mediante un hibridoma KM341-1-19, que están representadas respectivamente por SEQ ID NO: 28 y 30; una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera del anticuerpo producido mediante un hibridoma 2105, que están representadas respectivamente por SEQ ID NO: 32 y 34; una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera del anticuerpo producido mediante un hibridoma 110, que están representadas respectivamente por SEQ ID NO: 36 y 38; una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera del anticuerpo producido mediante un hibridoma 115, que están representadas respectivamente por SEQ ID NO: 40 y 42; una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera del anticuerpo producido mediante un hibridoma KM643-4-11, que están representadas respectivamente por SEQ ID NO: 52 y 54; una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera del anticuerpo producido mediante un hibridoma F2-103, que están representadas respectivamente por SEQ ID NO: 60 y 62; o una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera del anticuerpo producido mediante un hibridoma F5-77, que están representadas respectivamente por SEQ ID NO: 64 y 66.
- 10
- 15
- 20 (8) Un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, que tiene secuencias de aminoácidos de las porciones maduras de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que están codificadas por secuencias de ácido nucleico aisladas a partir de un hibridoma KM341-1-19, que están representadas respectivamente por SEQ ID NO: 27 y 29; una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que están codificadas por secuencias de ácido nucleico aisladas a partir de un hibridoma 2105, que están representadas respectivamente por SEQ ID NO: 31 y 33; una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que están codificadas por secuencias de ácido nucleico aisladas a partir de un hibridoma 110, que están representadas respectivamente por SEQ ID NO: 35 y 37; una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que están codificadas por secuencias de ácido nucleico aisladas a partir de un hibridoma 115, que están representadas respectivamente por SEQ ID NO: 39 y 41; una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que están codificadas por secuencias de ácido nucleico aisladas a partir de un hibridoma KM643-4-11, que están representadas respectivamente por SEQ ID NO: 51 y 53; una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que están codificadas por secuencias de ácido nucleico aisladas a partir de un hibridoma F2-103, que están representadas respectivamente por SEQ ID NO: 59 y 61; o una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que están codificadas por secuencias de ácido nucleico aisladas a partir de un hibridoma F5-77, que están representadas respectivamente por SEQ ID NO: 63 y 65.
- 25
- 30
- 35 (9) Un anticuerpo frente a un CD40 humano, o un fragmento funcional del mismo, que tiene al menos una propiedad seleccionada de las siguientes propiedades (g) a (j) de:
- 40 (g) neutralizar la acción de ligandos sobre CD40;
- (h) neutralizar o aliviar uno o más efectos que los ligandos, que son para CD40 en una línea de células B establecida, tienen sobre células que expresan CD40, y tener acción agonista sobre CD40 sobre la línea de células B establecida anterior más débil que la de 5D12 debido a reticulación mediante anticuerpos anti-inmunoglobulina;
- 45 (i) aliviar o neutralizar la acción de ligandos de CD40 sobre la línea de células B establecida para aumentar la expresión de CD95; y
- 50 (j) tener acción antagonista sobre CD40 expresado sobre células dendríticas.

(10) El anticuerpo o el fragmento funcional de (9) anterior puede suprimir la expresión de CD95 en células Ramos hasta un nivel de aproximadamente el 10% o menos que el de un control, cuando se añaden anticuerpos con una concentración de 0,1 µg/ml a las células Ramos con una concentración de 1×10^6 células/ml complementadas con una cantidad saturada de células que expresan CD40L; puede suprimir la expresión de CD95 en células Ramos hasta el mismo nivel que el de un control negativo, cuando se añaden los anticuerpos con una concentración de 1 µg/ml; y puede suprimir la expresión de CD95 en las células Ramos hasta el mismo nivel que el del control negativo, cuando se añaden los anticuerpos con una concentración de 10 µg/ml.

(11) El anticuerpo o el fragmento funcional del mismo de (9) anterior, en el que la proliferación de células B de las amígdalas se suprime *in vitro* en de aproximadamente el 80 al 95% o más, cuando se añaden los anticuerpos con una concentración de entre 0,001 µg/ml y 10 µg/ml a 1×10^5 células B de las amígdalas complementadas con CD40L soluble (1 µg/ml). Por ejemplo, cuando se añaden los anticuerpos con una concentración de entre 0,01 µg/ml y 10 µg/ml, se suprime la proliferación de células B de las amígdalas en aproximadamente el 95% o más. En particular, cuando se añaden los anticuerpos con una concentración de 0,001 µg/ml, se suprime la proliferación de células B de las amígdalas en aproximadamente el 80% o más.

(12) Un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, que tiene secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera del anticuerpo producido mediante un hibridoma KM281-1-10 (n.º de registro: FERM BP-7579), 4D11 (n.º de registro: FERM BP-7758) o F4-465 (n.º de registro: ATCC PTA-3338).

Nombre	N.º de registro	Fecha de depósito	Depositado con:
KM281-1-10	FERM BP-7579	9 de mayo de 2001	International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Central 6, 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón)
4D11	FERM BP-7758	27 de septiembre de 2001	
F4-465	ATCC PTA-3338	24 de abril de 2001	Colección americano de cultivos tipo (<i>American Type Culture Collection</i>) (10801 University Blvd. Manassas, VA 20110-2209, EE.UU.)

(13) Un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, que tiene secuencias de aminoácidos de las porciones maduras de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera del anticuerpo producido mediante un hibridoma KM281-1-10, que están representadas respectivamente por SEQ ID NO: 44 y 46; una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera del anticuerpo producido mediante un hibridoma 4D11, que están representadas respectivamente por SEQ ID NO: 48 y 50; o una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera del anticuerpo producido mediante un hibridoma F4-465, que están representadas respectivamente por SEQ ID NO: 56 y 58.

(14) Un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, que tiene secuencias de aminoácidos de las porciones maduras de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que están codificadas por secuencias de ácido nucleico aisladas a partir de un hibridoma KM281-1-10, que están representadas respectivamente por SEQ ID NO: 43 y 45; una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo producido por un hibridoma 4D11, que están representadas respectivamente por SEQ ID NO: 47 y 49; o una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que están codificadas por secuencias de ácido nucleico aisladas a partir de un hibridoma F4-465, que están representadas respectivamente por SEQ ID NO: 55 y 57.

(15) Los ejemplos del anticuerpo o el fragmento funcional del mismo de (1) a (14) anteriores incluyen anticuerpos humanos.

(16) Una composición farmacéutica, que contiene como principio activo el anticuerpo o el fragmento funcional del mismo de uno cualquiera de (1) a (15) anteriores.

(17) Un agente inmunopotenciador, agente antitumoral o agente anti-enfermedad autoinmunitaria, que contiene como principio activo el anticuerpo o el fragmento funcional del mismo de uno cualquiera de (1) a (8) anteriores.

(18) Un agente inmunosupresor, agente anti-enfermedad autoinmunitaria, agente terapéutico contra alergias o agente terapéutico contra el síndrome de inhibición del factor VIII de coagulación sanguínea, que contiene como principio activo el anticuerpo o el fragmento funcional del mismo de uno cualquiera de (9) a (14) anteriores.

(19) En el presente documento, puede determinarse un epítipo de un CD40 humano que el anticuerpo monoclonal de la presente invención reconoce mediante un método conocido, tal como examinando la unión a oligopéptidos

5 sintéticos solapantes obtenidos a partir de la secuencia de aminoácidos primaria de CD40 humano (por ejemplo, Ed Harlow y David Lane (ed.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, 1988 Cold Spring Harbor Laboratory Press; patente estadounidense n.º 4708871). También puede usarse un kit de biblioteca de péptidos con el proceso de presentación en fago (New England BioLabs) para el mapeo de epítomos. La presente invención también abarca un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo que reconoce un epítomo novedoso de CD40 humano que el anticuerpo o el fragmento funcional del mismo producido por cada uno de los hibridomas anteriores reconoce.

10 (20) La presente invención proporciona además un ácido nucleico (ARN o ADNc) que codifica al menos para la región variable de una cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo aislado a partir de cada uno de los hibridomas anteriores, un vector que contiene el ácido nucleico y una célula huésped que porta el ácido nucleico.

15 La presente invención se describirá en detalle. Esta memoria descriptiva incluye parte o todos los contenidos dados a conocer en la memoria descriptiva y/o los dibujos de la solicitud PCT PCT/US01/13672 (presentada el 27 de abril de 2001), la solicitud de patente japonesa n.º 2001-142482 (presentada el 11 de mayo de 2001), la solicitud de patente japonesa n.º 2001-310535 (presentada el 5 de octubre de 2001) y la solicitud de patente estadounidense USSN 10/040.244 (presentada el 26 de octubre de 2001) que son documentos de prioridad de la presente solicitud.

20 Tal como se describe a continuación, se ha encontrado que un anticuerpo monoclonal conocido 5D12 (n.º de la ATCC HB-11339) que es antagonista para CD40 en células B no es antagonista para CD40 en DC. Se ha encontrado además que muchos anticuerpos monoclonales muestran actividad agonista por sí mismos como resultado de reticulación mediante anticuerpos anti-inmunoglobulina, incluso si son anticuerpos antagonistas que bloquean la acción de CD40L.

25 1. Definición

Los términos usados en esta memoria descriptiva se definen tal como sigue.

30 El término "CD40 humano" en la presente invención significa un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada por Clark *et al.* (E. A. Clark *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4494, 1986) o Stamenkovic *et al.* (I. Stamenkovic *et al.*, *EMBO J.* 8: 1403, 1989). Específicamente, el CD40 humano es un polipéptido antigénico que se expresa sobre la superficie de una célula B, DC, macrófago, célula endotelial, célula epitelial o células tumorales de estas células.

35 El término "anticuerpo monoclonal anti-CD40" significa cualquier anticuerpo monoclonal contra CD40 expresado por una célula, CD40 de longitud completa o CD40 de longitud parcial. Un anticuerpo monoclonal anti-CD40 más preferido se une a la porción extracelular de CD40 y proporciona acción agonista o antagonista sobre las células que expresan CD40.

40 Además, el término "anticuerpo" en la presente invención se deriva de un gen (denominado de manera genérica "gen de anticuerpo") que codifica para una región variable de cadena pesada, una región constante de cadena pesada, una región variable de cadena ligera y una región constante de cadena ligera que componen una inmunoglobulina. El anticuerpo de la presente invención abarca un anticuerpo que es de cualquier clase de inmunoglobulina y tiene cualquier isotipo. El término "fragmento funcional" del anticuerpo en la presente invención es una parte (un fragmento parcial) de un anticuerpo tal como se definió anteriormente, y significa un fragmento que conserva una o más acciones del anticuerpo sobre un antígeno. Los ejemplos específicos de tal fragmento funcional incluyen F(ab')₂, Fab', Fab, Fv, FV con enlace disulfuro, FV monocatenario (scFV) y polímeros de los mismos (D. J. King., *Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies.*, 1998 T. J. International Ltd).

50 El término "anticuerpo humano" en la presente invención significa un anticuerpo que es el producto de expresión de un gen de anticuerpo derivado de ser humano.

55 El término "agonista" significa una acción para promover la unión de ligandos de CD40 a CD40 expresado sobre las superficies de células tales como células B, células tumorales o células dendríticas, o una acción para proporcionar células que expresan CD40 con uno o más efectos que se proporcionan mediante ligandos de CD40 a células que expresan CD40. El término "anticuerpo agonista" significa un anticuerpo que tiene una acción agonista de este tipo.

60 El término "antagonista" significa una acción para inhibir la unión de ligandos de CD40 a CD40 expresado sobre las superficies de células tales como células B, células tumorales o células dendríticas, o una acción para neutralizar uno o más efectos que se proporcionan mediante los ligandos de CD40 a células que expresan CD40. El término "anticuerpo antagonista" significa un anticuerpo que tiene una acción de este tipo.

65 El término "células dendríticas (DC)" en la presente invención indica un grupo de células que también se denominan leucocitos dendríticos que tiene una fuerte función de presentación de antígenos. Las células dendríticas usadas en el presente documento se inducen cultivando células precursoras positivas para CD34 contenidas en, por ejemplo, médula ósea, sangre de cordón umbilical o sangre periférica. Alternativamente, las células dendríticas pueden obtenerse cultivando monocitos positivos para CD14 en sangre periférica en presencia de GM-CSF e IL-4.

El término "DC inmaduras" significa DC que son negativas para CD14, fuertemente positivas para CD1a, positivas para CD83, CD86 y positivas para CMH de clase II.

5 El término "DC maduras" significa DC que son negativas para CD14, positivas para CD1a y que se han vuelto fuertemente positivas para CD83, CD86 y CMH de clase II.

10 El término "activar DC" en la presente invención significa un cambio en el que se inducen DC en respuesta a la estimulación mediante CD40. Por ejemplo, también significa provocar la maduración de DC inmaduras, la alta expresión de CD80, CD86 y HLA-clase II, y la potenciación de la producción de IL-12. Alternativamente, cuando coexisten células T, también significa estimular células T para promover su proliferación.

15 El término "activar células B y una línea de células B" en la presente invención significa un cambio en el que se inducen células en respuesta a la estimulación mediante CD40. Por ejemplo, significa provocar la síntesis de ADN, promover la incorporación de timidina y por tanto aumentar la cantidad de expresión de CD95.

2. Obtención del anticuerpo

20 Para obtener el anticuerpo de la presente invención, se prefiere inmunizar ratones usando como antígeno una línea celular de ratón recombinante génica que expresa un CD40 humano o un CD40 humano soluble que se ha producido y purificado con recombinantes. Se prefiere usar ratones para la inmunización para producir anticuerpos humanos (Tomizuka, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA., 2000 vol. 97: 722). Seleccionando anticuerpos monoclonales que se unen a CD40 humano soluble que se ha producido y purificado con recombinantes, pueden obtenerse más fácilmente anticuerpos que reaccionan también frente a CD40 expresado sobre células distintas de células B que en un caso en el que se seleccionan clones que reaccionan específicamente frente a células B. Pueden producirse hibridomas mediante el método de Kohler y Milstein *et al.* (Nature, 1975 vol. 256: 495) usado generalmente en la producción de anticuerpos monoclonales usando las células de ganglios linfáticos o esplenocitos de ratones inmunizados.

30 Además, la unión de CD40L soluble a CD40 se analiza usando un sistema de resonancia de plasmones de superficie tal como BIAcore 2000 (Biacore), y entonces se seleccionan anticuerpos que no compiten con CD40L. Además, se seleccionan anticuerpos que suprimen independientemente la supresión del crecimiento celular de linfoma B. Además, se realiza la selección de anticuerpos usando la condición de si actúan o no sobre DC como indicador. Esto permite la producción y selección de anticuerpos con ventajas de actuar sobre células dendríticas o células B sin competir con CD40L, y suprimir la proliferación de células cancerosas que expresan CD40.

40 El anticuerpo de la presente invención se obtiene cultivando el hibridoma así obtenido. Además, se clona un gen que codifica para un anticuerpo monoclonal humano o una región variable del mismo a partir de una célula que produce anticuerpos tal como una célula B o un hibridoma, el gen clonado se incorpora en un vector apropiado, y entonces se introduce el vector en un huésped (por ejemplo, una línea celular de mamífero, *Escherichia coli*, célula de levadura, célula de insecto o célula vegetal), de modo que puede prepararse un anticuerpo recombinante producido mediante tecnología de recombinación génica (P. J. Delves., ANTOBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES., 1997 WILEY, P. Shepherd y C. Dean., Monoclonal Antibodies., 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS; J. W. Goding., Monoclonal Antibodies: principles and practice., 1993 ACADEMIC PRESS). Además, se genera ganado, cabras, ovejas o cerdos transgénicos, en los que se incorpora un gen de anticuerpo diana en el gen endógeno mediante técnicas de generación de animales transgénicos. A partir de la leche de estos animales transgénicos, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales derivados a partir del gen de anticuerpo en grandes cantidades. Cuando se cultivan hibridomas *in vitro*, se hacen crecer, se mantienen y almacenan de una manera adecuada para diversas condiciones tales como las propiedades de especies celulares que van a cultivarse, fines de experimentos y estudios, y métodos de cultivo. Entonces, pueden cultivarse los hibridomas usando cualquier medio de nutrientes que se induce y prepara a partir de un medio de nutrientes conocido o medio básico conocido que se usa para la producción de anticuerpos monoclonales en el sobrenadante de cultivo.

3. Selección

55 La selección de anticuerpos agonistas se realiza mediante análisis usando linfoma B humano, de modo que pueden seleccionarse los anticuerpos que promueven la expresión de CD95. Se añaden además anticuerpos a una disolución de cultivo de DC purificada, y entonces se seleccionan anticuerpos que provocan maduración. Alternativamente, se seleccionan anticuerpos que muestran actividad para hacer proliferar células T en una reacción de linfocitos mixtos usando DC inmaduras. Además, se añaden anticuerpos frente a DC maduras, y entonces se seleccionan anticuerpos que tienen acción para promover la producción de IL-12. Además, se seleccionan anticuerpos que tienen actividad para suprimir el crecimiento de células tumorales que expresan CD40 o actividad para inducir la muerte celular de las células tumorales. Puede distinguirse la competición con CD40L de otros casos basándose en si el anticuerpo inhibe o no la unión de CD40 soluble con ligandos de CD40 soluble usando, por ejemplo, un sistema de resonancia de plasmones de superficie (BIOCore). Alternativamente, también puede distinguirse de otros casos basándose en si el anticuerpo potencia o no la acción de ligandos de CD40 sobre una

línea de células B.

La selección de anticuerpos antagonistas se realiza mediante análisis usando linfoma B humano. La adición adicional de CD40L soluble que tiene FLAG como etiqueta en presencia de anticuerpo anti-FLAG permite la selección de anticuerpos que inhiben más fuertemente la unión de CD40L soluble a CD40 sobre las células de linfoma B humano. Mediante la introducción de un que codifica para CD40L en lugar de CD40L soluble, también es posible usar células recombinantes que expresan muchos ligandos de CD40 sobre la superficie celular. Posteriormente, se reticular anticuerpos humanos con anticuerpos anti-IgG humana, de modo que se eliminan clones que activan linfoma B mediante reticulación. Además, se seleccionan anticuerpos que muestran actividad para suprimir la proliferación de células T en una reacción de linfocitos mixtos usando DC purificadas y maduras, o anticuerpos que tienen acción para suprimir la producción de IL-12 cuando se añaden ligandos de CD40 a DC maduras.

Los anticuerpos que se obtienen tal como se describió anteriormente tienen al menos cualquiera de las siguientes propiedades que se cree que son terapéuticamente eficaces.

(1) En el caso de anticuerpo agonista

(a) El anticuerpo actúa sobre células dendríticas para provocar la producción de IL-12 en presencia de LPS (lipopolisacárido) e IFN γ . La concentración de LPS en este caso oscila entre 10 pg/ml y 10 ng/ml y la concentración de IFN γ oscila entre 10⁻⁴ M y 10⁻² M. Con una concentración de anticuerpo de 1 μ g/ml o más, o preferiblemente 0,1 μ g/ml o más, la cantidad de producción de IL-12 es mayor que la de en una prueba usando un anticuerpo G28-5 como control, el anticuerpo anti-CD40 agonista conocido. Cuando se añaden los anticuerpos con una concentración de 0,1 μ g/ml o más a células dendríticas con una concentración de 1x10⁶ células/ml, 100 pg/ml o más se produce IL-12, o cuando se añaden los mismos con una concentración de 1 μ g/ml o más, 1.000 pg/ml o más, o preferiblemente, 10.000 pg/ml o más se produce IL-12 (véanse los ejemplos 9 y 13).

(b) El anticuerpo tiene acción de unión a células dendríticas y por tanto provoca la maduración de las células dendríticas. Además, cuando se cultivaron los anticuerpos con una concentración de 20 μ g/ml o menos, preferiblemente de 0,1 a 15 μ g/ml; más preferiblemente de 5 a 15 μ g/ml con células dendríticas, la actividad que provoca la maduración es más alta que la del anticuerpo G28-5 (véase el ejemplo 9).

(c) El anticuerpo tiene actividad para promover la expresión de CD95 de una línea de células B establecida, que es mayor que la del anticuerpo G28-5. En este caso, con una concentración de anticuerpo de 10 μ g/ml o más, preferiblemente 1 μ g/ml o más, preferiblemente de manera adicional 0,1 μ g/ml o más, todavía preferiblemente de manera adicional 0,01 μ g/ml o más, y lo más preferiblemente 0,001 μ g/ml o más, la actividad para promover la expresión de CD95 es más alta que la del anticuerpo G28-5 que se usa como control en una prueba. Las razones de actividad del anticuerpo G28-5, que se usó en una prueba como control, para promover la expresión de CD95 con respecto a las mismas del anticuerpo con concentraciones de 10 μ g/ml, 1 μ g/ml, 0,1 μ g/ml y 0,01 μ g/ml son tal como se muestran a continuación (tabla 1).

Tabla 1

Concentración de anticuerpo	Razón
10 μ g/ml	Aproximadamente 2 veces, de manera preferible aproximadamente 3 veces, más preferiblemente 4,5 veces, y preferiblemente de manera adicional 6 veces
1 μ g/ml	Aproximadamente 2 veces, de manera preferible aproximadamente 5 veces, de manera más preferible aproximadamente 6 veces, y más preferiblemente de manera adicional 7 veces
0,1 μ g/ml	2 veces, preferiblemente 6 veces, de manera más preferible aproximadamente 7 veces
0,01 μ g/ml	2 veces, preferiblemente 4 veces, más preferiblemente 5 veces, preferiblemente de manera adicional aproximadamente 6 veces

La expresión promovida de CD95 significa que el anticuerpo activa la línea de células B establecida. En el presente documento, los ejemplos de la línea de células B establecida incluyen células Ramos y células HS-Sulton. Además, las células Ramos son de linfoma de Burkitt, que son células modelo de células B centroblásticas humanas. Las células HS-Sulton son de linfoma de Burkitt (véanse los ejemplos 6 y 12).

(d) El anticuerpo tiene actividad para suprimir la síntesis de ADN, incorporación de timidina y proliferación de la línea de células B establecida (células Ramos o células HS-Sulton), que es más alta que la del anticuerpo G28-5. La concentración de anticuerpo en este caso es de al menos 0,05 μ g/ml, o preferiblemente de 0,1 a 15 μ g/ml (véase el ejemplo 8).

(e) El anticuerpo induce la muerte celular de la línea de células B establecida (véase el ejemplo 16).

(f) El anticuerpo no inhibe la unión de ligandos de CD40 a CD40. El término “no inhibe” significa que CD40L puede unirse a CD40 en el mismo grado que cuando el anticuerpo está ausente, incluso cuando el anticuerpo se une previamente a CD40 (es decir, en presencia del anticuerpo). O bien uno de o bien ambos ligandos de CD40 y CD40 pueden ser de un tipo de una proteína que se expresa sobre la membrana o una proteína soluble (véase el ejemplo 11).

Se producen anticuerpos que tienen las propiedades anteriores, por ejemplo, mediante un hibridoma KM302-1 (FERM BP-7578) y un hibridoma KM341-1-19 (FERM BP-7759).

Se determinaron las secuencias de nucleótidos y secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada (cadena H) y cadena ligera (cadena L) de un anticuerpo monoclonal producido mediante el hibridoma KM341-1-19 (ejemplo 17). La presente invención proporciona ADN que codifica al menos para la región variable de cadena pesada, o la cadena pesada de longitud completa y ADN que codifica para la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal producido mediante el hibridoma KM341-1-19. Los ADN también incluyen otros ADN que codifican para las mismas secuencias de aminoácidos debido a la degeneración de codones además de los descritos en el ejemplo 17. Además, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales o fragmentos funcionales de los mismos tal como se especifica mediante las secuencias de aminoácidos de al menos las regiones variables de cadena pesada o las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas de longitud completa, y las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera, tal como se da a conocer en el ejemplo 17.

(2) En el caso de anticuerpo antagonista

(g) El anticuerpo neutraliza la acción de ligandos para CD40. En el presente documento, el término “la acción de ligandos” significa tanto la acción de ligandos expresados sobre células T u otras células, como la acción de ligandos libres para CD40 (véanse los ejemplos 7 y 14).

(h) El anticuerpo neutraliza uno o más efectos que los ligandos para CD40 en la línea de células B establecida tienen sobre células que expresan CD40, y no muestran acción agonista frente a CD40 en la línea de células B establecida anterior mediante reticulación mediante anticuerpos anti-inmunoglobulina. Esta acción es más débil que la de 5D12. Los “efectos que los ligandos tienen sobre células que expresan CD40” significa la activación de las células que expresan CD40. Específicamente en células B, el efecto significa la activación de la incorporación de timidina y proliferación de células B, y la activación de la expresión potenciada de CD95 en la línea de células B establecida. Además, en DC, el efecto significa la activación de la maduración de DC, la activación de la expresión potenciada de CD86 y HLA-DR, la activación de la incorporación de timidina por las células T coexistentes, la promoción de la proliferación, la activación de la producción de IL-12 e IL-10, y similares. La reticulación mediante anticuerpos anti-inmunoglobulina se realiza provocando la presencia de 0,1 µg/ml o más de anticuerpos anti-inmunoglobulina en una disolución de cultivo (véase el ejemplo 7).

(i) El anticuerpo alivia o neutraliza la actividad de CD40L reticulado o CD40L expresado por células para potenciar la expresión de CD95 en la línea de células B establecida. El anticuerpo también alivia o neutraliza la actividad de CD40L, cuya acción se potencia mediante reticulación mediante anticuerpos y similares contra etiquetas. La unión de ligandos (incluyendo tanto ligandos libres como ligandos expresados por células específicas) para CD40 a células que expresan CD40 provoca transducción de señales intracelulares, y finalmente provoca que las células expresen CD95 (Fas) sobre las superficies celulares. Por consiguiente, el anticuerpo antagonista de la presente invención inhibe la transducción de señales anterior uniéndose a CD40, neutralizando de ese modo la expresión de CD95. La concentración de anticuerpo en este caso es de 1 µg/ml o más, o preferiblemente de 0,1 µg/ml o más (véanse los ejemplos 7 y 14).

(j) El anticuerpo es antagonista frente a CD40 en DC. Específicamente, el anticuerpo alivia o neutraliza la actividad de CD40L para activar DC. Cuando se estimulan DC mediante ligandos en células T que coexisten con las DC, se activan las células T, de manera que se promueven la incorporación de timidina y similares. En la reacción de linfocitos mixtos, en la que se permite que coexistan DC y células T que se derivan ambas de individuos diferentes, DC interaccionan con células T, provocando de ese modo la activación de células T. El anticuerpo antagonista de la presente invención inhibe la interacción anterior uniéndose a CD40, dando como resultado la supresión de la incorporación de timidina. La concentración de anticuerpo en este caso es de al menos 0,001 µg/ml, o preferiblemente de 0,1 a 10 µg/ml (véase el ejemplo 10).

El anticuerpo antagonista anterior se produce mediante, por ejemplo, hibridomas KM281-1-10 (FERM BP-7579) y KM281-2-10-1-2 (FERM BP-7580) (9 de mayo de 2001, the International Patent Organism Depository (IPOD) en el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Central 6, 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki) y 4D11 (FERM BP-7758).

(3) El anticuerpo de la presente invención puede alterarse para dar un anticuerpo de una subclase diferente (por ejemplo, véase la publicación EP314161), mediante modificación mediante técnicas de ingeniería genética

conocidas por un experto en la técnica, específicamente mediante sustitución de una región que define la subclase de una cadena pesada de anticuerpo por una región que define otra subclase. Pueden unirse directamente una región variable de cadena pesada y la región constante de otra subclase. Por ejemplo, una alteración de la subclase del anticuerpo de la presente invención a IgG2 o IgG4 hace posible disminuir el grado de unión del anticuerpo a un receptor de Fc. Específicamente, se introduce el sitio Nhe I (GCTAGC) en una cadena pesada de anticuerpo humana, sitio de EU index 118 (Ala), 119 (Ser) según Kabat *et al* (Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)). Mediante digestión usando la enzima de restricción, puede realizarse el cambio a otra subclase, IgG, sin alterar el aminoácido. Además, la alteración artificial de la secuencia de aminoácidos de una región constante, o la unión de una secuencia de región constante que tiene una secuencia alterada de este tipo con la región variable del anticuerpo de la presente invención puede disminuir el grado de unión a un receptor de Fc (Lund J., *et al.*, J. Immunol. 1991 vol 147: 2657-2662), o también puede aumentar o disminuir la actividad de CDC (Tao M., *et al.*, J. Exp. Med. 1991 vol 1025-1028, Idusogie E E., *et al.*, J. Immunol. 2001 vol. 166: 2571-5). Además, para evitar la acción de CCDA, CDC o similares, sólo pueden seleccionarse previamente anticuerpos de subclase IgG2 o IgG4. Además, la unión de un radionúclido, toxina bacteriana, agente quimioterápico, profármaco o similares con el anticuerpo de la presente invención puede potenciar adicionalmente el efecto terapéutico contra una enfermedad tal como cáncer.

4. Composición farmacéutica

Una composición farmacéutica que contiene una preparación farmacéutica que es el anticuerpo purificado de la presente invención también se abarca por el alcance de la presente invención. Una composición farmacéutica de este tipo contiene preferiblemente un diluyente o portador fisiológicamente aceptable además del anticuerpo, o puede ser una mezcla con otros anticuerpos u otros fármacos, tales como antibióticos. Los ejemplos del portador apropiado incluyen, pero no se limitan a, una solución salina fisiológica, una solución salina tamponada con fosfato, una solución salina de glucosa tamponada con fosfato y una solución salina fisiológica tamponada. Alternativamente, el anticuerpo se liofiliza, y entonces se usa cuando sea necesario añadiendo la disolución acuosa tamponada anterior para su reconstrucción. Los ejemplos de la vía de administración incluyen una vía oral y una vía parenteral incluyendo inyecciones intravenosas, intramusculares, hipodérmicas e intraperitoneales o suministro del fármaco.

En este caso, la dosis eficaz que va a administrarse como una combinación de la dosis eficaz del anticuerpo de la presente invención, un diluyente apropiado y un portador farmacológicamente aceptable oscila entre 0,1 mg y 100 mg por kg de peso corporal por administración. La administración se realiza a intervalos de 2 días a 8 semanas.

Cuando se usa una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo de la presente invención, y particularmente, cuando se usa el anticuerpo agonista, la composición se usa como fármaco inmunopotenciador (agente antiviral y fármaco antiinfeccioso), agente antitumoral o agente anti-enfermedad autoinmunitaria. Múltiples ejemplos de estas enfermedades pueden aparecer a la vez. Alternativamente, el anticuerpo también puede usarse como adyuvante en combinación con una vacuna tal como un péptido específico de cáncer. Cuando la composición contiene el anticuerpo antagonista, es útil como agente inmunosupresor (agente profiláctico o terapéutico contra rechazo inmunológico o GVHD tras el trasplante de islotes de Langerhans, riñones o similares) tras el trasplante de órganos o un agente anti-enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, contra el reuma, o como agente terapéutico contra esclerosis arterial, esclerosis diseminada, lupus eritematoso sistémico, trombocitopenia idiopática o enfermedad de Crohn), agente terapéutico contra alergias tales como asma, o agente terapéutico contra el síndrome de inhibición del factor VIII de coagulación sanguínea. Múltiples ejemplos de estas enfermedades pueden aparecer a la vez.

Cuando el anticuerpo anti-CD40 se usa como medio terapéutico contra una enfermedad en la que está implicado CD40, puede esperarse que puedan obtenerse anticuerpos que proporcionan un mejor efecto terapéutico seleccionando los anticuerpos usando la función de DC como indicador.

En el caso del anticuerpo agonista, puede esperarse que puedan obtenerse anticuerpos que tienen una fuerte acción de inmunopotenciación seleccionando anticuerpos que pueden activar DC más eficazmente. Además, usando la promoción de la producción de IL-12 por DC maduras como indicador, pueden obtenerse anticuerpos que tienen fuerte acción de inducción de CTL. Mediante la inducción de CTL, pueden obtenerse anticuerpos que son altamente eficaces para eliminar células infectadas con virus o células tumorales. Además, puesto que pueden esperarse efecto sinérgicos, los anticuerpos preferidos se unen a CD40 sin inhibir la unión de ligandos de CD40 a CD40. Cuando se considera el tratamiento contra el cáncer, si están presentes anticuerpos que inducen directamente la muerte celular de células cancerosas que expresan CD40 o suprimen su proliferación, y activan de manera eficaz DC, se esperan efectos sinérgicos de éstos, y tales anticuerpos pueden ser un agente terapéutico que puede usarse contra tumores que no expresan CD40. Se considera que estos anticuerpos son útiles como agentes terapéuticos contra enfermedades virales o agentes antitumorales.

Al mismo tiempo, también se espera que anticuerpos que se unen específicamente a CD40 y suprimen la unión de CD40L sin activar CD40 puedan suprimir no sólo la acción de ligandos para células B, sino también la acción sobre DC. Sin embargo, hasta la fecha se han obtenido anticuerpos usando como indicador su efecto sobre células B. Por tanto, es altamente significativo obtener anticuerpos que tienen una fuerte acción supresora también sobre células

dendríticas y desarrollarlos como producto farmacéutico. Además, es de interés que el anticuerpo anti-CD40 pueda tener una acción totalmente opuesta mediante reticulación tal como se describió anteriormente. Por tanto, se requieren anticuerpos que no activan CD40 ni siquiera mediante reticulación. También es de interés que anticuerpos monoclonales derivados a partir de un mamífero no humano tal como un ratón, anticuerpos quiméricos que consisten en la región variable de un anticuerpo monoclonal de ratón y una región constante de una inmunoglobulina humana y anticuerpos humanizados que resultan del injerto de CDR, que se han notificado hasta la fecha como anticuerpos contra CD40 humano, tengan antigenicidad. Por tanto, es deseable un anticuerpo humano como anticuerpo para inhibir la unión con ligandos de CD40.

10 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra que anticuerpos KM302-1 promovían la expresión de CD95.

15 La figura 2A muestra que los anticuerpos antagonistas neutralizaban la acción de ligandos de CD40 sobre células Ramos.

La figura 2B muestra que los anticuerpos antagonistas neutralizaban la acción de ligandos de CD40 sobre células Ramos.

20 La figura 3 muestra que anticuerpos KM281-1-10 neutralizaban la acción de ligandos de CD40 sobre células Ramos.

La figura 4 muestra que anticuerpos KM281-1-10 reticulados no promovían la expresión de CD95.

25 La figura 5 muestra que anticuerpos 5D12 reticulados promovían la expresión de CD95.

La figura 6 muestra el efecto supresor de la proliferación de anticuerpos KM302-1 sobre células tumorales.

La figura 7 muestra que anticuerpos KM302-1 promovían la maduración de DC.

30 La figura 8 muestra que anticuerpos KM302-1 promovían la producción de IL-12 de DC.

La figura 9 muestra que anticuerpos KM281-1-10 neutralizaban la acción de ligandos de CD40 sobre DC.

35 La figura 10 muestra que anticuerpos KM281-1-10 neutralizaban la acción de ligandos de CD40 sobre DC.

La figura 11 muestra que anticuerpos KM302-1 activaban DC-MLR inmaduras.

La figura 12 muestra que anticuerpos KM341-1-19 y similares promovían la expresión de CD95 de células Ramos.

40 La figura 13 muestra que anticuerpos KM341-1-19 promovían la producción de IL-12 de DC maduras.

La figura 14 muestra que anticuerpos KM341-1-19 promovían la producción de IL-10 de DC maduras.

45 La figura 15 muestra que anticuerpos 4D11 y similares neutralizaban la acción de ligandos de CD40 sobre células Ramos.

La figura 16 muestra que anticuerpos KM302-1 mostraban efecto antitumoral en el modelo de ratón trasplantado con células tumorales humanas.

50 La figura 17 muestra que anticuerpos KM341-1-19 mostraban un efecto supresor de la proliferación contra células tumorales.

La figura 18 muestra que F4-465, 4D11 y KM281-1-10 suprimían la producción de IgG específica de antígeno.

55 La figura 19 muestra que F4-465, 4D11 y KM281-1-10 suprimían la producción de IgM específica de antígeno.

La figura 20 muestra que F4-465 suprimía la proliferación de células de las amígdalas.

60 **B. MEJOR MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION**

La presente invención se describirá en detalle en referencia a los ejemplos. Sin embargo, el alcance técnico de la invención no se limita por estos ejemplos.

65 [Ejemplo 1] Preparación de antígeno

(1) Célula

Las células EL-4 son de una línea de células T establecida derivada de ratón, y pueden obtenerse fácilmente (n.º de la ATCC: TIB-39). Se adquirieron células Ramos B (n.º de la ATCC: CRL-1596) e hibridoma G28-5 (HB-9110) y 5D12 (HB-11339) que producen anticuerpo anti-CD40 de ratón de la ATCC.

(2) Expresión y purificación de antígeno

Se amplificaron regiones extracelulares mediante PCR usando ADNc de CD40 (número de registro de Genbank: NM_001250) como molde y los siguientes cebadores en las condiciones de 20 ciclos de 95°C durante 5 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos.

Cebador 1: 5'-CCCAGATCTGTCCATCCAGAACCACCCACTGCATGCAGAG-3' (SEQ ID NO: 1)

Cebador 2: 5'-ACAAGATCTGGGCTCTACGTATCTCAGCCGATCCTGGGGAC-3' (SEQ ID NO: 2)

Se insertó el ADNc amplificado tras la secuencia señal de melitina y antes de la región FC derivada de IgG2a de ratón o FC derivada de IgG1 humana de un vector pFastBac (Gibco BRL). Para producir CD40, se prepararon baculovirus recombinantes según las instrucciones. Se infectaron células Th5 con los virus recombinantes, y entonces se cultivaron durante 4 días. Se trató el sobrenadante con un filtro de 0,22 nm, se añadió al mismo proteína G-Sepharose (Amersham Pharmacia) y entonces se agitó suavemente la mezcla a 4°C. Tras una noche, se transfirió la Sepharose a una columna y entonces se lavó con un volumen de 20x de PBS. Se eluyó proteína FC frente a CD40 humano con un tampón glicina 20 mM (pH 3,0). Se obtuvo el vector para expresar CD40 sobre las superficies celulares de Randolph J. Noelle (Inui, S *et al.*, *EJI*, 20, 1747-1753, 1990). Se escindió el ADNc de longitud completa con la enzima *Xba* I, y entonces se insertó en pCDNA3 (INVITROGEN). Se introdujo el vector en células EL-4, y entonces se cultivaron las células en presencia de G418 0,5 mg/ml (Gibco BRL), obteniendo de ese modo una cepa de expresión estable. Se confirmó la expresión de CD40 mediante análisis de FACS usando anticuerpos anti-CD40 humano conjugados con FITC (Pharmingen).

[Ejemplo 2] Generación de ratones para la inmunización

Los ratones usados para la inmunización tenían antecedentes genéticos por los cuales eran homocigotos para ambas cadena ligera κ y cadena pesada de Ig endógenas alteradas, y los ratones albergaban al mismo tiempo un fragmento del cromosoma 14 (SC20) que contenía un locus génico de cadena pesada de Ig humana, y un transgén de cadena $Ig\kappa$ humana (KCo5). Se generaron estos ratones cruzando ratones de una línea A que tenía un locus génico de cadena pesada de Ig humana con ratones de una línea B que tenía un transgén de cadena $Ig\kappa$ humana. Los ratones de la línea A son homocigotos para ambas cadena ligera κ y cadena pesada de Ig endógenas alteradas, y albergan un fragmento del cromosoma 14 (SC20), que puede transmitirse a la progenie, tal como se describe, por ejemplo, en el informe de Tomizuka *et al.* (Tomizuka, *et al.*, *Proc Natl Acad. Sci USA.*, 2000 vol. 97: 722). Se inmunizaron los ratones de la línea A, de modo que se obtuvieron los siguientes hibridomas F2-103 y F5-77. Además, los ratones de la línea B (ratones transgénicos) son homocigotos para ambas cadena ligera κ y cadena pesada de Ig endógenas alteradas, y albergan un transgén de cadena $Ig\kappa$ humana (KCo5), tal como se describe, por ejemplo, en el informe de Fishwild *et al.* (*Nat Biotechnol.*, 1996 vol. 14:845).

Se usaron individuos obtenidos cruzando ratones macho de la línea A con ratones hembra de la línea B, o ratones hembra de la línea A con ratones macho de la línea B, y que tenían una cadena ligera κ y cadena pesada de Ig humana detectadas simultáneamente en los sueros (Ishida & Lonberg, *IBC's 11th Antibody Engineering*, Abstract 2000) para el siguiente experimento de inmunización. Además, los ratones productores de anticuerpos humanos anteriores están disponibles de Kirin Brewery Co., Ltd por medio de contrato. Inmunizando los ratones anteriores, se obtuvieron los siguientes hibridomas KM302-1, KM341-1-19, KM643-4-11, 2053, 2105, 3821, 3822, 285, 110, 115, KM281-1-10, KM281-2-10-1-2, KM283-5, KM292-1-24, KM225-2-56, KM341-6-9, 4D11, 5H10, 11E1, 5G3, 3811, 3411 y 3417. Además, también se usaron ratones quiméricos (Kuroiwa *et al.*, *Nat Biotechnol.*, 2000 vol. 18:1086) que albergaban cadena lambda de anticuerpo humano notificados por Kuroiwa *et al.* para el siguiente experimento de inmunización. Se obtuvo un hibridoma F4-465 a partir del ratón.

[Ejemplo 3] Preparación de anticuerpo monoclonal humano contra CD40 humano

Se prepararon anticuerpos monoclonales en este ejemplo según un método general descrito en la Introducción de Procedimientos Experimentales para Anticuerpos Monoclonales (escrito por Tamie ANDO *et al.*, KODANSHA, 1991). El CD40 humano usado como inmunógeno en el presente documento fue la FC frente a CD40 humano FC y células EL-4 que expresan CD40 preparadas en el ejemplo 1. Los animales usados en el presente documento para la inmunización fueron ratones que producían anticuerpos humanos que producían la inmunoglobulina humana preparada en el ejemplo 2.

Se inmunizaron los ratones que producían anticuerpos humanos con de 2 a 100 μ g/inmunización de CD40: hFc por ratón. Excluyendo la primera inmunización, se mezcló una disolución de antígeno con un volumen equivalente de

adyuvante incompleto de Freund (Sigma), y entonces se inyectó por vía subcutánea en varias posiciones separadas. Se realizó la inmunización de 3 a 4 veces aproximadamente cada de 10 días a 3 semanas. Para la primera inmunización, se usó adyuvante incompleto de Freund (Sigma). Se recogió sangre de la cola del ratón, y entonces se midieron los anticuerpos γ y κ contra CD40 en el suero usando ELISA. De 3 a 4 días antes de la extirpación del bazo, se realizó la inmunización final inyectando 20 μ g de CD40: Fc disuelta en PBS por medio de la vena caudal.

Se inmunizaron los ratones que producían anticuerpos humanos con células EL-4 de ratón que expresaban CD40 humano. Se suspendieron células EL-4 (10^8 células/ml) en PBS, y entonces se mezclaron suavemente con un volumen equivalente de adyuvante RIBI emulsionado previamente con PBS. Se realizó la inmunización con las células de 3 a 5 veces aproximadamente cada de 10 días a 3 semanas. Cuando no se usó el adyuvante, se irradiaron las células con rayos X con 8000 rad para su uso.

Se obtuvo quirúrgicamente el bazo de los ratones inmunizados. Se mezclaron los esplenocitos recogidos con mieloma de ratón SP2/0 (n.º de la ATCC: CRL1581) a una razón de 5 a 1. Se fusionaron las células usando polietilenglicol 1500 (Boehringer Mannheim) como agente para la fusión celular, preparando de ese modo un gran número de hibridomas. Se realizó la selección de hibridomas mediante cultivo en medio DMEM que contenía HAT (Gibco BRL) complementado con suero de ternero fetal al 10% (FCS), hipoxantina (H), aminopterina (A) y timidina (T). Además, se obtuvieron clones individuales mediante el método de dilución limitante usando medio DMEM que contenía HT. Se realizó el cultivo en una placa de microtitulación de 96 pocillos (Beckton Dickinson). Se realizó la selección de clones de hibridomas que producían anticuerpos monoclonales humanos anti-CD40 humano mediante medición usando ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) y clasificador celular activado por fluorescencia (FACS), tal como se describe más adelante en el ejemplo 4.

Se realizó la selección del hibridoma que producía anticuerpo monoclonal mediante ELISA mediante 3 tipos de análisis de ELISA y FACS tal como se describe a continuación. Por tanto, se obtuvo un gran número de hibridomas que producían anticuerpos monoclonales humanos que tenían cadena γ de inmunoglobulina humana (Ig γ) y cadena ligera κ de inmunoglobulina humana, y tenían reactividad específica frente a CD40 humano. En cualquiera de los siguientes ejemplos incluyendo este ejemplo, y las tablas y las figuras que muestran los resultados de pruebas de los ejemplos, cada clon de hibridoma que producía el anticuerpo monoclonal humano anti-CD40 humano de la presente invención se indicó usando símbolos. Un clon representado mediante los símbolos seguido por "anticuerpo" significa un anticuerpo que se produce por cada uno de los hibridomas, o un anticuerpo recombinante que se produce por una célula huésped que porta un gen de anticuerpo (longitud completa o una región variable) aislado del hibridoma. Además, dentro de un intervalo contextualmente claro, el nombre de un clon de hibridoma puede expresar el nombre de un anticuerpo.

Los siguientes clones de hibridoma representan clones individuales.

Anticuerpo agonista:

KM302-1, KM341-1-19, KM643-4-11, 2053, 2105, 3821, 3822, 285, 110, 115, F1-102, F2-103, F5-77 y F5-157.

Anticuerpo antagonista:

KM281-1-10, KM281-2-10-1-2, KM283-5, KM292-1-24, KM225-2-56, KM341-6-9, 4D11, 5H10, 11E1, 5G3, 3811, 3411, 3417 y F4-465.

Se depositaron 3 clones de hibridoma KM 302-1, KM 281-1-10 y KM 281-2-10-1-2 entre ellos el 9 de mayo de 2001, se depositaron los clones K341-1-19 y 4D11 el 27 de septiembre de 2001 y se depositó el clon 2105 el 17 de abril de 2002, en el International Patent Organism Depositary en el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Central 6, 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón) según el tratado de Budapest. Se depositaron plásmidos que tenían las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de F2-103, F5-77 y F5-157 el 19 de abril de 2001, y se depositaron los clones de hibridoma F1-102 y F4-465 el 24 de abril de 2001 en la ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Blvd., Manassas, Virginia, EE.UU.) según el tratado el Budapest (tabla 2).

Tabla 2

Nombre	N.º de registro
KM302-1	FERM BP-7578
KM281-1-10	FERM BP-7579
KM281-2-10-1-2	FERM BP-7580
KM341-1-19	FERM BP-7759
4D11	FERM BP-7758
2105	FERM BP-8024
F1-102	ATCC PTA-3337

F4-465	ATCC PTA-3338
Cadena pesada de F2-103 (F2-103-H)	ATCC PTA-3302
Cadena ligera de F2-103 (F2-103-L)	ATCC PTA-3303
Cadena pesada de F5-77 (F5-77-H)	ATCC PTA-3304
Cadena ligera de F5-77 (F5-77-L)	ATCC PTA-3305
Cadena pesada de F5-157 (F5-157-H)	ATCC PTA-3306
Cadena ligera de F5-157 (F5-157-L)	ATCC PTA-3307

[Ejemplo 4] Selección de hibridomas

Detección de anticuerpo monoclonal que tiene cadena γ de inmunoglobulina humana

5 Se añadió la FC de ratón frente a CD40 humano (1 $\mu\text{g/ml}$) preparada en el ejemplo 1 a 50 $\mu\text{l/pocillo}$ a cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos para el ELISA (Maxisorp, Nunc) y se incubó a 4°C para que la FC de ratón frente a CD40 humano se adsorbiera a la microplaca. A continuación, se desechó el sobrenadante, y entonces se añadió un reactivo de bloqueo (Block Ace, DAINIPPON PHARMACEUTICAL) a cada pocillo, seguido por incubación a temperatura ambiente para el bloqueo. Se añadió el sobrenadante de cultivo (50 μl) de cada hibridoma a cada pocillo para la reacción, y entonces se lavó cada pocillo con un tampón fosfato que contenía Tween20 al 0,1% (PBS-T). Entonces se diluyó 5.000 veces anticuerpo de cabra anti-IgG (γ) humana (Sigma, A0170) marcado con peroxidasa con PBS-T que contenía FBS al 1%. Se añadió la disolución (50 $\mu\text{l/pocillo}$) a cada pocillo, y entonces se realizó la incubación. Se lavó la microplaca 3 veces con PBS-T, y entonces se añadió una disolución de sustrato cromogénico (TMB, 50 $\mu\text{l/pocillo}$, SUMITOMO BAKELITE) a cada pocillo, seguido por incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió una disolución de detención (50 $\mu\text{l/pocillo}$) a cada pocillo para detener la reacción. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm con un lector de microplacas. Se analizó el sobrenadante de cultivo de pocillos positivos mediante FACS, y entonces se seleccionaron los pocillos en los que se tiñeron células Ramos. Se clonaron las células en los pocillos mediante el método de dilución limitante, y entonces se obtuvieron las células de 1 clon por pocillo. Se confirmó el estado positivo para h κ mediante ELISA usando la FC de ratón frente a CD40 humano. Como resultado, se obtuvieron anticuerpos anti-CD40 humano de 173 clones de 20 ratones. Se mostraron algunos de estos anticuerpos en la tabla 3 (anticuerpos agonistas) y la tabla 4 (anticuerpos antagonistas). Entre los anticuerpos agonistas, al menos KM341-1-19 y 2105 no competían significativamente con ligandos en una prueba competitiva usando células que expresan CD40L, células que expresan CD40 y los anticuerpos.

Tabla 3 Anticuerpo agonista

Hibridoma	Antígeno	Subclase	DC	Célula tumoral
KM302-1	FC de ratón frente a CD40	IgG4	activada	proliferación suprimida
KM341-1-19	EL-4 que expresa CD40 humano	IgG2	activada	proliferación suprimida
KM643-4-11	FC de ratón frente a CD40	IgG1	no implementado	no implementado
2053	FC de ratón frente a CD40	IgG2	no implementado	no implementado
2105	FC de ratón frente a CD40	IgG2	no implementado	no implementado
3821	EL-4 que expresa CD40 humano	IgG3	no implementado	no implementado
3822	EL-4 que expresa CD40 humano	IgG3	no implementado	no implementado
285	FC de ratón frente a CD40	IgG1	no implementado	no implementado
110	FC de ratón frente a CD40	IgG4	no implementado	no implementado
115	FC de ratón frente a CD40	IgG4	no implementado	no implementado
F2-103	FC de ratón frente a CD40	IgG1	no implementado	no implementado
F5-77	FC de ratón frente a CD40	IgG1	no implementado	no implementado

30

Tabla 4 Anticuerpo antagonista

Hibridoma	Antígeno	Subclase	Efecto de reticulación	DC-MLR
KM281-1-10	FC de ratón frente a CD40	IgG1	bajo	suprimida
KM281-2-10-1-2	FC de ratón frente a CD40	IgG1	bajo	no implementado
KM283-5	FC de ratón frente a CD40	IgG4	significativo	no suprimida
KM225-2-56	FC de ratón frente a CD40	IgG4	significativo	no implementado
KM292-1-24	FC de ratón frente a CD40	IgG2	significativo	no implementado
KM341-6-9	EL-4 que expresa CD4 humano	IgG1	significativo	no implementado
4D11	FC de ratón frente a CD40	IgG1	bajo	no implementado
5H10	FC de ratón frente a CD40	IgG1	bajo	no implementado
11E1	FC de ratón frente a CD40	IgG1	bajo	no implementado
5G3	FC de ratón frente a CD40	IgG2	significativo	no implementado
3811	EL-4 que expresa CD40 humano	IgG1	significativo	no implementado
3411	EL-4 que expresa CD40 humano	IgG2	significativo	no implementado

3417	EL-4 que expresa CD40 humano	IgG2	significativo	no implementado
F4-465	EL-4 que expresa CD40 humano	IgG1	no implementado	no implementado

Se detectaron anticuerpos monoclonales que tenían cadena ligera κ (Ig κ) de inmunoglobulina humana de una manera similar al método de ELISA descrito anteriormente para cadena γ de inmunoglobulina humana excepto porque se usaron anticuerpos de cabra anti-Ig κ humana (diluidos 1.000 veces, 50 μ l/pocillo, Southern Biotechnology) marcados con peroxidasa.

Se identificó la subclase de cada anticuerpo monoclonal de una manera similar al método de ELISA anterior para cadena γ de inmunoglobulina humana, excepto porque se usó un anticuerpo de oveja anti-IgG1 humana, anticuerpo de oveja anti-IgG2 humana, anticuerpo de oveja anti-IgG3 humana o anticuerpo de oveja anti-IgG4 humana (cada uno diluido 2.000 veces, 50 μ l/pocillo, The Binding Site) marcado con peroxidasa.

Prueba de reacción de cada anticuerpo monoclonal contra células humanas que expresan CD40

Se estudió la reactividad de cada anticuerpo monoclonal contra una línea de células Ramos que se notifica que expresa CD40 mediante análisis de FACS.

Se suspendió la línea de células Ramos a una concentración de 2×10^6 /ml en un tampón de tinción (SB) de NaN_3 al 0,1% y PBS que contenía FCS al 2%. Se distribuyó la suspensión de células (100 μ l/pocillo) en una placa de fondo redondo de 96 pocillos (Beckton Dickinson). Se añadió el sobrenadante de cultivo (50 μ l) de cada hibridoma, y entonces se realizó la incubación a temperatura helada durante 30 minutos. Se usaron anticuerpos de IgG1 humana contra albúmina sérica humana como control negativo, y se prepararon a una concentración de 2 μ g/ml con un medio de cultivo de hibridomas. Se añadieron 50 μ l de la disolución, y entonces se realizó la incubación a temperatura helada durante 15 minutos. Tras lavar con SB, se añadieron 50 μ l de anticuerpo anti-ser humano marcado con fluorescencia de R-PE (Southern Biotechnology) diluido 250 veces, y entonces se realizó la incubación a temperatura helada durante 15 minutos. Tras lavar dos veces con SB, se suspendió el producto en de 300 a 500 μ l de un tampón de FACS, y entonces se midió la intensidad de fluorescencia de cada célula mediante FACS (FACSort y FACScan, Beckton Dickinson). Como resultado, se seleccionaron anticuerpos que tenían actividad de unión para la línea de células Ramos.

[Ejemplo 5] Preparación de cada anticuerpo

Se preparó el sobrenadante de cultivo que contenía anticuerpos monoclonales mediante el siguiente método.

Se obtuvo un hibridoma que producía anticuerpo G28-5 de la ATCC (n.º de la ATCC HB-9110). Se aclimataron hibridomas que producían anticuerpos anti-CD40 en medio eRDF (Kyokutoseiyaku) que contenía insulina bovina (5 μ g/ml, Gibco BRL), transferrina humana (5 μ g/ml, Gibco BRL), etanolamina (0,01 mM, Sigma) y selenito de sodio ($2,5 \times 10^{-5}$ nM, Sigma). Se cultivaron los hibridomas en un matraz agitador. Cuando la tasa de células viables de los hibridomas alcanzó el 90%, se recogió el sobrenadante de cultivo. Se aplicó el sobrenadante recogido a filtros de 10 μ m y 0,2 μ m (German Science) para eliminar residuos misceláneos tales como hibridomas.

Se purificaron anticuerpos anti-CD40 a partir del sobrenadante de cultivo anterior mediante el siguiente método. Se sometió el sobrenadante de cultivo que contenía los anticuerpos anti-CD40 a purificación por afinidad usando una columna de proteína A Hyper D (NGK INSULATORS, LTD) o una columna de proteína G (para purificar IgG1 de ratón, Amersham Pharmacia Biotech) según las instrucciones adjuntas usando PBS (-) como tampón de adsorción y tampón citrato de sodio 0,1 M (pH 3) como tampón de elución. Se añadió disolución de Na_2HPO_4 o Tris-HCl 1 M (pH 8,0) para ajustar la fracción de elución para que tuviese un pH de alrededor de 7,2. Se sustituyó la disolución de anticuerpo preparada con PBS (-) usando una membrana de diálisis (corte de 10000, Spectrum Laboratories) o una columna SP (Amersham Pharmacia Biotech), y entonces se realizó la esterilización mediante filtración usando un filtro de membrana MILLEX-GV (MILLIPORE) con un tamaño de poro de 0,22 μ m. Se halló la concentración del anticuerpo purificado midiendo la absorbancia a 280 nm y luego calculando con 1 mg/ml a DO de 1,45.

[Ejemplo 6] Promoción de la expresión de CD95 en células Ramos mediante anticuerpo anti-CD40 agonista

Se inoculó una suspensión de células Ramos de $5,0 \times 10^5$ células/ml a 100 μ l/pocillo (5×10^4 células por pocillo) en una placa de 96 pocillos. Se diluyó el sobrenadante de cultivo de hibridomas o el anticuerpo purificado hasta 20 μ g/ml con un medio, y entonces se añadió la disolución a una concentración de 100 μ l/pocillo a una placa de 96 pocillos. Tras el cultivo durante la noche, se recogieron las células y entonces se analizaron mediante FACScan o FACSort (Beckton Dickinson) usando anticuerpos anti-CD95 marcados con R-PE (Pharmingen NJ). La figura 1 muestra el resultado. Los ejes horizontales en la figura 1 indican la intensidad de expresión de CD95. La adición de anticuerpos se indica con una línea gruesa, y la no adición de anticuerpos se indica con una línea fina. Se mostró que los anticuerpos KM302-1 promovían la expresión de CD95 mejor que los anticuerpos G28-5, que eran los anticuerpos conocidos. Es decir, se mostró que el anticuerpo KM302-1 era más eficazmente agonista.

[Ejemplo 7] Supresión de la expresión de CD95 en células Ramos mediante anticuerpo anti-CD40 antagonista

Se inoculó una suspensión de células Ramos de $1,0 \times 10^6$ células/ml a 50 μ l/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se ajustó el sobrenadante de cultivo de hibridomas o el anticuerpo purificado a 2 μ g/ml con un medio, y entonces se añadió a 100 μ l/pocillo a una placa de 96 pocillos. Se añadieron ligandos de CD40 solubles (4 μ g/ml, ALEXIS CORPORATION) y anticuerpos anti-FLAG (4 μ g/ml, M2, Sigma) a los medios, y entonces se añadieron los medios a 50 μ l/pocillo a la placa de 96 pocillos. Tras el cultivo durante la noche, se recogieron las células y entonces se analizaron mediante FACS usando anticuerpos anti-CD95 marcados con R-PE (Pharmingen NJ). Las figuras 2A y 2B, y 3 muestran los resultados. Los ejes horizontales en las figuras indican la intensidad de expresión de CD95. Se suprimió la expresión de CD95 hasta el mismo grado que la de un control negativo mediante los anticuerpos producidos por cada uno de los siguientes hibridomas: KM281-1-10, KM281-2-10-1-2, KM283-5, KM292-1-24 y KM225-2-56.

En la figura 3, los anticuerpos KM281-1-10 (panel inferior) suprimieron la expresión de CD95 más eficazmente que la de los anticuerpos 5DC2 (panel central), el anticuerpo conocido, suprimió sólo ligeramente la expresión de CD95. Específicamente, se mostró que el anticuerpo KM281-1-10 era más eficazmente antagonista. Por tanto, se mostró que el anticuerpo monoclonal humano era un anticuerpo antagonista.

Efecto de reticulación mediante anticuerpo anti-inmunoglobulina

Se inoculó una suspensión de células Ramos de $1,0 \times 10^6$ células/ml a 50 μ l/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se ajustó el sobrenadante de cultivo de hibridomas o el anticuerpo purificado a 2 μ g/ml con un medio, y entonces se añadió a 100 μ l/pocillo a una placa de 96 pocillos. Se añadieron anticuerpos anti-IgG humana (Sigma, 13382) o anticuerpos anti-IgG de ratón (Biosource, AMI3401) a 4 μ g/ml a los medios, y entonces se añadieron los medios a 50 μ l/pocillo a una placa de 96 pocillos. Tras el cultivo durante la noche, se recogieron las células, y entonces se analizaron mediante FACS usando anticuerpos anti-CD95 marcados con R-PE (Pharmingen NJ). Las figuras 4 y 5 muestran los resultados. Los ejes horizontales en las figuras indican la intensidad de expresión de CD95. Se suprimió la expresión de CD95 mediante los anticuerpos producidos por cada uno de los hibridomas KM281-1-10 y K281-2-10-1-2. A la inversa, se potenció la expresión de CD95 mediante los anticuerpos producidos por cada uno de los siguientes hibridomas, 5D12, K283-5, KM292-1-24 y KM225-2-56.

[Ejemplo 8] Supresión de la proliferación en células Ramos mediante anticuerpo anti-CD40 agonista

Se inoculó una suspensión de células Ramos y HS-Sulton de $1,0 \times 10^5$ células/ml a 100 μ l/pocillo a una placa de 96 pocillos. Se añadió a los medios una mezcla de cantidad equivalente de los anticuerpos purificados o ligandos de CD40 solubles, y anticuerpos anti-FLAG (M2). Tras 2 días de cultivo, se añadieron 10 μ l de 3 H-timidina 100 μ Ci/ml (Amersham Pharmacia). Tras 18 horas, se recogió el producto de cultivo en un instrumento Printed Filtermat A (Wallac) usando un colector Macro 96 (SKATRON), se secó y entonces se sumergió bien en Betap;Scint (Wallac). Tras el envasado, se midió la actividad usando un contador de centelleo líquido 1205 BETAPLATE. La figura 6 muestra los resultados. En la figura, los ejes longitudinales indican la cantidad de 3 H-timidina incorporada por las células, y los ejes horizontales indican la concentración del anticuerpo o CD40L en la disolución de cultivo. Cuando se añadieron los anticuerpos KM302-1 a células Ramos y células HS-Sulton, la cantidad de timidina incorporada era inferior que la de anticuerpos G28-5 convencionales y CD40L. Por tanto, se mostró que el anticuerpo KM302-1 es un anticuerpo agonista que puede suprimir eficazmente la proliferación de células tumorales.

[Ejemplo 9] Activación de células dendríticas mediante anticuerpo agonista frente a CD40

(1) Materiales y métodos

Se adquirió IL-4 humana recombinante de Genzyme techne. Se adquirieron perlas de MACS anti-CD14 humano de Miltenyi Biotech GmbH. Se adquirió Lymphoprep de Nycomed Pharma AS. El medio usado para el cultivo fue RPM11640 (Gibco BRL) complementado con FCS inactivado con calor al 10% (Cell Culture Technologies), HEPES 10 mM (Sigma), 2-mercaptoetanol 55 μ M (Gibco BRL) y sulfato de estreptomina (MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.), cuando se indujeron DC. Se lavaron las células en un procedimiento de tinción con PBS (Sigma) complementado con FCS al 2% (Cell Culture Technologies) y Azaid al 0,02%. Cuando se congelaron las células, se usó Cell banker (Nippon Zenyaku Kogyo).

(2) Inducción de DC derivadas de monocitos

Se prepararon células mononucleares (PBMC) a partir de sangre periférica mediante centrifugación en gradiente de densidad usando Lymphoprep. Se sometieron las células a selección positiva usando perlas de MACS anti-CD14 humano, para separar las células en una fracción negativa y una fracción positiva para CD14. Se añadieron GM-CSF humano recombinante (50 ng/ml) e IL-4 humana recombinante (100 ng/ml) a la fracción positiva, seguido por el cultivo en medio RPM11640 complementado con FCS al 10% en una placa de 6 pocillos. Al comienzo del cultivo, se cultivaron las células a una concentración de 1×10^6 /ml (3 ml por pocillo). Durante el cultivo, se intercambiaron los

medios una vez cada 2 días. Se realizó el intercambio de medio tomando muestras del 10% de la disolución de cultivo en un tubo de centrifugación, centrifugando la disolución, eliminando el sobrenadante, suspendiendo con una nueva disolución de cultivo (que contenía citocina y similares a la concentración anterior) en un volumen 2 veces mayor que la disolución de cultivo de la que se tomaron muestras, y entonces devolviendo la suspensión a cada pocillo. El día 6 de cultivo, se recogieron las células, se calculó el número de células, y entonces se suspendieron las células a una concentración de 1×10^6 /ml en el medio anterior. Se añadieron anticuerpos anti-CD40 o los controles de isotipo de los mismos al medio, y entonces se cultivaron durante 4 días adicionales en una placa de 24 pocillos. Durante este periodo, no se realizó intercambio de cultivo (número de células por pocillo de 1×10^6 células, y concentración de células de 1×10^6 /ml).

(3) Tinción de células y análisis mediante citómetro de flujo

Para la tinción, se usaron anticuerpos anti-HLA-DR (control de isotipo: IgG2a de rata), anticuerpos anti-CD86 (control de isotipo: IgG1 de rata) y anticuerpos anti-CD83 (control de isotipo: IgG2b de rata). En primer lugar, se añadieron los anticuerpos, y entonces se realizó la incubación a 4°C durante 30 minutos. Tras 3 lavados, se realizó el análisis usando el instrumento FACS Calibur (Beckton Dickinson).

(4) Aumento en la capacidad de secreción de IL-12 de DC maduras

Tras obtenerse DC inmaduras tal como se describió anteriormente, se añadieron LPS (400 pg/ml) e $\text{IFN}\gamma$ (10^{-3} M), y entonces se realizó el cultivo durante 2 días, obteniendo de ese modo DC maduras. A las DC maduras, se la añadieron anticuerpos anti-CD40 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o el control de isotipo. Para el sobrenadante tras 24 horas, se midió la producción de IL-12 usando ELISA (Pharmingen).

(5) Resultados y discusión

La figura 7 muestra el efecto de anticuerpos KM302-1, los anticuerpos agonistas, sobre la maduración de DC, y la figura 8 muestra el efecto de anticuerpos KM302-1 sobre la producción de IL-12 de DC maduras. Se comparó el grado de maduración con anticuerpos G28-5 como control. Cuando se examinaron la expresión de CD86 y la de HLA-DR, la expresión estaba elevada adicionalmente, es decir, el grado de maduración aumentó en el caso de anticuerpos KM302-1 en comparación con el caso de anticuerpos G28-5. También se mostró que la secreción de IL-12 aumentó mediante el tratamiento de DC maduras con anticuerpos KM302-1. Por consiguiente, se mostró que los anticuerpos KM302-1 actuaban como anticuerpos agonistas sobre DC.

[Ejemplo 10] DC-MLR

Se centrifugó sangre (sangre periférica) recogida de un ser humano normal a 2000 rpm durante 10 minutos, y entonces se absorbió el suero. Se resuspendió la fracción de células sanguíneas con PBS, y entonces se colocó suavemente sobre Ficoll (Amersham Pharmacia). Se realizó la centrifugación a 2000 rpm durante 30 minutos, de modo que se recogió una porción de PBMC en la capa intermedia, se lavó dos veces con PBS y entonces se usó para un determinado proceso de separación de células usando MACS.

Se realizó la separación de monocitos para cultivar DC según las instrucciones adjuntas usando MACS (Miltenyi Biotec GmbH). Esto se explica brevemente tal como sigue. Se añadieron 800 μl de tampón de MACS y 200 μl de CD14 de MACS (Miltenyi Biotec GmbH, 502-01) a PBMC (1×10^8), y entonces se trataron a 4°C durante 15 minutos. Se adsorbieron las células a una columna LS de MACS, y entonces se lavaron. Se recogieron las células adsorbidas a la columna como monocitos. Se añadió HLA-DR de MACS (Miltenyi Biotec GmbH, 461-01) a las células que no se adsorbieron a la columna. Se eliminaron células positivas para HLA-DR con una columna BS, preparando de ese modo una fracción células T. Se midió la proporción de células positivas para CD3 mediante FACS, y entonces se calculó un número sustancial de células T a partir del número de células totales en la fracción de células T. Se cultivaron los monocitos obtenidos en medio R0 (medio RPMI complementado con β -mercaptoetanol (Gibco) y HEPES (SIGMA)) que contenía IL-4 100 ng/ml (R&D system), G-CSF 50 ng/ml (KIRIN) y FCS al 10% (SIGMA) a una concentración de 1×10^6 células/ml en una placa de cultivo de 6 pocillos. El día 5 tras el cultivo, se añadió LPS 10 ng/ml (DIFCO) para que las células se diferenciases en DC maduras.

Se realizó MLR mezclando células T y DC maduras, que se habían aislado de diferentes seres humanos. La razón celular de células T con respecto a DC se determinó como 1:80, y el número de células T se determinó como 2×10^5 células/pocillo. En primer lugar, se añadieron anticuerpos frente a DC para que la reacción avanzara durante 30 minutos. Posteriormente, se añadieron células T, se realizó el cultivo durante 4 días y entonces se añadieron 10 μl de ^3H -Timidina 100 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ (Amersham Pharmacia). 14 horas más tarde, se recogieron las células en un instrumento Printed Filtermat A (Wallac) usando un colector Macro 96 (SKATRON), se secaron y entonces se sumergieron bien en Betap;Scint (Wallac). Tras el envasado, se midió la actividad usando un contador de centelleo líquido 1205 BETAPLATE. Se realizó MLR usando DC inmaduras mezclando células T con DC maduras, que se habían aislado de diferentes seres humanos. Con una razón celular de células T con respecto a DC de 1:40, se realizó MLR de manera similar. Las figuras 9 y 10 muestran los resultados. Se mostró que la adición de anticuerpos KM281-1-10

disminuyó la incorporación de timidina, y por tanto podía suprimirse MLR. Además, se mostró en la figura 10 que anticuerpos KM283-5 y 5D12 no podían suprimir DC-MLR. Es decir, sólo el anticuerpo KM281-1-10 es un anticuerpo antagonista que neutraliza la acción de ligandos de CD40 sobre DC. Además, la figura 11 muestra los resultados del examen del efecto de anticuerpos KM302-1, que son anticuerpos agonistas, sobre MLR usando DC inmaduras. La activación de DC promovió la interacción con células T, y provocó un aumento en la incorporación de timidina. Estos resultados indicaron que KM302-1 es un anticuerpo agonista que actúa sobre DC inmaduras.

[Ejemplo 11] Efecto de anticuerpo frente a CD40 sobre la unión de CD40L a CD40

Se provocó que anticuerpos anti-CD40 se unieran a FC humana frente a CD40 inmovilizada usando BIAcore 2000 (Biacore), y entonces se midieron los cambios en la cantidad de unión de CD40L soluble a CD40. Según las instrucciones adjuntas al sistema, se inmovilizó FC humana frente a CD40 soluble sobre un chip CM (CM5, Biacore). A continuación, se añadieron anticuerpos anti-CD40 25 µg/ml para unirse a CD40. Además, se añadió CD40L soluble 10 µg/ml para la unión. Se midió la diferencia entre las cantidades de unión antes y después de la adición de CD40L. Cuando se añadió IgG de control, la cantidad de unión de CD40L era de 100 UR. Tras la adición de anticuerpos KM302-1, la cantidad de unión de CD40L era de 110 UR, y tras la adición de anticuerpos KM283-5 la cantidad de unión de CD40L era de 18 UR. Por tanto, se mostró que el anticuerpo KM302-1 no inhibe la unión de CD40L a CD40.

[Ejemplo 12] Promoción de la expresión de CD95 en células Ramos mediante anticuerpo anti-CD40 agonista

Se analizaron anticuerpos purificados de los hibridomas obtenidos en el ejemplo 4 según el método del ejemplo 6, y entonces se seleccionaron clones que producían anticuerpos agonistas (número de células por pocillo: 5×10^3 ; concentración de células: $2,5 \times 10^5$ /ml). La figura 12 muestra los resultados. En la figura, el eje horizontal indica la concentración de anticuerpo en disoluciones de cultivo, y el eje longitudinal indica las intensidades de fluorescencia promedio, es decir, intensidades de expresión de CD95. A una concentración de 0,01 µg/ml o más, se mostró que anticuerpos KM341-1-19 y 2105 promovían la expresión de CD95 de células Ramos más eficazmente que anticuerpos G28-5, que son anticuerpos de ratón conocidos. Específicamente, se mostró que anticuerpos KM341-1-19 y 2105 eran anticuerpos agonistas más eficaces. Además, la actividad agonista (para aumentar la expresión de CD95 de células Ramos) de anticuerpos KM341-1-19 y 2105 (0,01 µg/ml) era superior a la de anticuerpos G28-5 (10 µg/ml) (figura 12). La tabla 5 resume, a cada concentración de anticuerpo, cuántas veces es el nivel de expresión de CD95 mayor o menor al expresado por la adición de anticuerpos G28-5.

Tabla 5

Concentración de anticuerpo (µg/ml)	K341-1-19	2105	F5-77	F2-103
0,01	5,7	3,9		
0,1	7,0	7,1	1,2	1,2
1	5,7	5,1	1,7	1,8
10	4,5	3,3	2,0	1,7

[Ejemplo 13] Activación de células dendríticas mediante anticuerpo agonista frente a CD40

Según el método del ejemplo 9, se examinó el efecto de anticuerpos agonistas frente a CD40 sobre la producción de IL-12 y la producción de IL-10 por DC maduras. Se midió IL-10 mediante el método de ELISA (Pharmingen). Las figuras 13 y 14 muestran los resultados. Se mostró que la secreción de IL-12 aumentaba mediante el tratamiento con anticuerpos KM341-1-19. En contraposición, incluso cuando se permitió que coexistiesen células L recombinantes que expresaban ligando de CD40 (2×10^5 células/ml) que se habían irradiado con rayos X (5000 rad), las concentraciones de IL-12 e IL-10 en disoluciones de cultivo eran de 254 y 51 pg/ml, respectivamente. Eran inferiores a cuando se añadieron anticuerpos KM341-1-19 1 µg/ml.

Tal como se describió anteriormente, se mostró que anticuerpos KM341-1-19 actúan sobre DC como anticuerpos agonistas eficaces. La actividad agonista de anticuerpos KM341-1-19 (0,1 µg/ml) para provocar que DC maduras secretasen IL-12 era superior a la de anticuerpos G28-5 (100 µg/ml). La actividad agonista de anticuerpos KM341-1-19 (1 µg/ml) para provocar que DC maduras secretasen IL-12 era 100 veces o más mayor que la de anticuerpos G28-5 (100 µg/ml) (figura 13). Además, la actividad agonista de anticuerpos KM341-1-19 (1 µg/ml) para provocar que DC maduras secretasen IL-10 era 10 veces o más mayor que la de anticuerpos G28-5 (100 µg/ml) (figura 14). Además, puesto que la subclase de anticuerpo KM341-1-19 era IgG2, el anticuerpo tiene una afinidad de unión inferior por el receptor de Fc que la de IgG1 o IgG3. Su capacidad para sensibilizar la actividad de destrucción de células NK y su capacidad para activar el sistema del complemento también son débiles. Por consiguiente, puede haber un riesgo bajo de que la función de células que expresan CD40 o el número de las propias células disminuya debido al anticuerpo. Además, el anticuerpo no se reticula fácilmente por un receptor de Fc, de modo que puede esperarse que el efecto del fármaco se controle fácilmente sin ninguna fluctuación grande en actividad agonista *in vivo* debido a reticulación.

[Ejemplo 14] Supresión de la expresión de CD95 en células Ramos mediante anticuerpo anti-CD40 antagonista

Se inoculó una suspensión de células Ramos de $1,0 \times 10^6$ células/ml a 50 μ l/pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo plano (número de células por pocillo: 5×10^4). Se añadieron anticuerpos purificados diluidos con medio a 100 μ l/pocillo a una placa de 96 pocillos. Se prepararon células L de ratón recombinante que expresaban ligando de CD40 humano (véase Spriggs, M.K. *et al.*, J. Exp. Med., 176: 1543, 1992; Garrone, P. *et al.*, J. Exp. Med., 182: 1265, 1995 y similares) a $1,0 \times 10^5$ células/ml. Se añadieron las células preparadas a 50 μ l/pocillo (el número de células Ramos por pocillo: 5×10^4 ; concentración de células Ramos: $2,5 \times 10^4$ células/ml; el número de células L de ratón por pocillo: 5×10^3 ; concentración de células de ratón: $2,5 \times 10^4$ células/ml). Tras el cultivo durante la noche, se recogieron las células, y entonces se analizaron mediante FACS usando anticuerpos anti-CD95 marcados con R-PE. La figura 15 muestra los resultados. En la figura, el eje longitudinal indica la intensidad de fluorescencia promedio, es decir, la intensidad de expresión de CD95. Mientras que los anticuerpos 5D12 conocidos suprimieron la expresión ligeramente, anticuerpos 4D11 suprimieron, incluso a una concentración de 0,1 μ g/ml, la expresión de CD95 en el mismo grado que el de un caso de un control negativo en el que no se habían añadido células que expresaban CD40L. Además, a una concentración de 1 μ g/ml, 4D11, F4-465 y KM281-1-10 suprimieron la expresión de CD95 en el mismo grado que el del caso del control negativo en el que no se habían añadido células que expresaban CD40L. Estos resultados mostraron que anticuerpos 4D11, F4-465 y KM281-1-10 son anticuerpos antagonistas más eficaces. La tabla 6 muestra valores relativos de la intensidad de fluorescencia promedio correspondiente a cada concentración de anticuerpo, cuando el valor del caso de control en el que no se añadieron anticuerpos antagonistas se determina como 100.

Tabla 6

Concentración de anticuerpo (μ g/ml)	5D12	4D11	F4-465	KM281-1-10
0,1	77,6	11,8	49,6	60,1
1	72,3	0,01	2,5	7,3
10	69,5	0	1,1	2,6

[Ejemplo 15] Efecto antitumoral en modelo de trasplante de células Ramos mediante anticuerpo anti-CD40 agonista

Se inyectaron por vía intravenosa anticuerpos anti-asialo GM1 a ratones C.B.17/lcr-scidJc1 de 5 semanas de edad (CLEA JAPAN). 1 día después, se inyectaron por vía intravenosa 5×10^6 células Ramos como células tumorales. 1 día después, se inyectaron por vía intravenosa anticuerpos KM302-1 o anticuerpos de IgG humana anti-albúmina sérica humana como control negativo. Las dosis por ratón de anticuerpos KM302-1 fueron de 1, 10 y 100 μ g, y las mismas de los anticuerpos de control negativo fueron de 100 μ g. Se administró cada uno de estos anticuerpos una vez a 5 ratones. La figura 16 muestra los resultados. Para el día 34 tras el trasplante, todos los ratones del grupo al que se le administró el control negativo habían muerto, mientras que los 5 ratones de cada uno de los grupos a los que se les administraron 10 μ g y 100 μ g de anticuerpos KM302-1 sobrevivieron. Por tanto, se confirmó el efecto antitumoral de anticuerpos KM302-1. El anticuerpo KM302-1 es de la subclase IgG4, de modo que la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) mediada por receptor de Fc y la activación del sistema del complemento son débiles. A pesar de estas características, se observó que la administración única de 10 μ g de anticuerpos KM302-1 prolongó el tiempo de supervivencia de ratones que llevaban tumores.

[Ejemplo 16] Supresión de la proliferación de células Ramos mediante anticuerpo anti-CD40 agonista

Se preparó una suspensión de células Ramos a 1×10^4 células/ml en un medio RPMI1640 complementado con FBS al 10%, y entonces se distribuyeron 100 μ l de la suspensión en una placa de 96 pocillos. Se añadió una disolución de ligandos solubles o anticuerpos KM341-1-19 a 20 μ g/ml usando medio. Se permitió que coexistieran anticuerpos anti-FLAG (M2) con la misma concentración que la de los ligandos con los ligandos solubles (la concentración en la disolución de reacción era de 10 μ g/ml), potenciando de ese modo la actividad. Tras 5 días de cultivo, se añadieron a cada pocillo 20 μ l de reactivo MTS (Promega), y entonces se permitió que reaccionara durante de 2 a 3 horas. Se midieron diferencias en la absorbancia entre los pocillos libres de células y libres de anticuerpos y se midieron los pocillos que contenían células y anticuerpos a una longitud de onda de 490 nm, midiendo de ese modo el recuento de células viables. Además, se comparó la acción de supresión de la proliferación con la de anticuerpos G28-5 usando una placa con fondo de U de 96 pocillos de manera similar. Se añadieron anticuerpos KM341-1-19 o anticuerpos G28-5 preparados a 2 μ g/ml usando medio. La figura 17 muestra los resultados. En pocillos a los que se les habían añadido anticuerpos KM341-1-19, se observaron células muertas, el número de células era significativamente inferior al de pocillos a los que se les habían añadido anticuerpos G28-5 o ligandos, y la absorbancia también era baja. Estos resultados indican que se suprimió la proliferación de células tumorales, y se indujo muerte celular.

[Ejemplo 17] Clonación de ADNc de gen de anticuerpo

Se cultivaron hibridomas que producían anticuerpos KM341-1-19, 2105, 110, 115, KM281-1-10, 4D11, KM643-4-11, F4-465, F2-103 y F5-77, y entonces se recogieron las células mediante centrifugación. Se añadió TRIZOL (Gibco

BRL) a las células, y entonces se extrajo el ARN total según las instrucciones adjuntas. Se realizó la clonación de las regiones variables del ADNc de anticuerpo según las instrucciones adjuntas usando un kit de amplificación de ADNc SMART RACE (CLONTECH). Usando 5 µg de ARN total como molde, se construyó ADNc de 1ª hebra. Para amplificar las cadenas pesadas (cadena H) de KM341-1-19, 2105, 110, 115, KM281-1-10, 4D11, KM643-4-11, F2-103 y F5-77, se usaron Z-Taq (Takara) y UMP y cebadores hh6, y se repitió un ciclo de 98°C durante 1 segundo y 68°C durante 30 segundos 30 veces. Además, usando 1 µl de la disolución de reacción como molde y NUMP y cebadores hh3, se repitió un ciclo de 98°C durante 1 segundo y 68°C durante 30 segundos 20 veces. Para amplificar la cadena pesada de F4-465, se usaron UMP y cebadores hh2 y un kit de PCR Advantage 2 (Clontech, n.º de cat. 1910), y se realizaron 5 ciclos de 94°C durante 5 segundos y 72°C durante 3 minutos, 5 ciclos de 94°C durante 5 segundos, 70°C durante 0 segundos y 72°C durante 3 minutos, y 25 ciclos de 94°C durante 5 segundos, 68°C durante 10 segundos y 72°C durante 3 minutos.

Cebador hh6: 5'-GGT CCG GGA GAT CAT GAG GGT GTC CTT-3' (SEQ ID NO: 3)

15 Cebador hh3: 5'-GTG CAC GCC GCT GGT CAG GGC GCC TG-3' (SEQ ID NO: 4)

Cebador hh2: 5'-GCT GGA GGG CAC GGT CAC CAC GCT G-3' (SEQ ID NO: 5)

20 Posteriormente, se purificó el producto de PCR amplificado usando un kit de purificación de PCR (QIAGEN), y entonces se determinó la secuencia de nucleótidos usando hh4 como cebador. Alternativamente, se subclonó el producto en PCR-Script (Stratagene, Lajolla, CA) o PCR-Blunt (Invitrogene, Carlsbad, CA), y entonces se realizó la secuenciación. Basándose en la información de secuencia, se sintetizaron cebadores específicos de cadenas pesadas de anticuerpos. Se sintetizó un cebador 341 H en el caso de KM341-1-19, un cebador 2105Hsal en el caso de 2105, un cebador 110Hsal en el caso de 110 y 115, un cebador 281Hsal en el caso de KM281-1-10, un cebador 4D11Sal en el caso de 4D11, un cebador 643Hsal en el caso de KM643-4-11, cebador en 5' H11-9 en el caso de F4-465, un cebador F2-103H en el caso de F2-103 y cebador F5-77H en el caso de F5-77. Usando los cebadores específicos de cadenas pesadas de anticuerpos y hh4, se amplificó el ADNc a partir del ADNc de 1ª hebra, y entonces se determinó la secuencia de la dirección opuesta usando el producto amplificado como molde y los cebadores específicos de anticuerpos.

30 Cebador hh4: 5'-GGTGCCAGGGGAAGACCGATGG-3' (SEQ ID NO: 6)

Cebador 341H: 5'-atatgtcgacGCTGAATTCTGGCTGACCAGGGCAG-3' (SEQ ID NO: 7)

35 2105sal: atatgtcgacTCCCAGGTGTTTCCATTCAGTGATCAG (SEQ ID NO: 8)

110Hsal: atatgtcgacTTCCATTCGGTGATCAGCACTGAACAC (SEQ ID NO: 9)

281Hsal: atatgtcgacTTTGAGAGTCCTGGACCTCCTGTG (SEQ ID NO: 10)

40 4D11Sal: atatgtcgacGAGTCATGGATCTCATGTGCAAG (SEQ ID NO: 11)

643Hsal: atatgtcgacCCAGGGCAGTCACCAGAGCTCCAGAC (SEQ ID NO: 12)

45 H11-9 en 5': -ACC GTG TCG ACT ACG CGG GAG TGA CT (SEQ ID NO: 13)

F2-103 H: accgtgtcgacgctgactcaggactgcaca (SEQ ID NO: 14)

F5-77 H: accgtgtcgacggtgactcaggactgaacag (SEQ ID NO: 15)

50 Se amplificaron las cadenas ligeras (cadenas L) de KM341-1-19, 2105, 110, 115, KM281-1-10, 4D11, KM643-4-11, F2-103 y F5-77 usando UMP y cebadores hk2 y repitiendo 30 veces un ciclo de 98°C durante 1 segundo y 68°C durante 30 segundos. Se amplificó la cadena ligera de F4-465 usando UMP y cebadores hL2 y repitiendo 30 veces un ciclo de 98°C durante 1 segundo y 68°C durante 30 segundos. Se purificó el producto de PCR amplificado usando un kit de purificación de PCR, y entonces se determinó la secuencia de nucleótidos usando cebadores hk6 o hL2. Basándose en las secuencias, se sintetizaron cebadores específicos de cadenas ligeras. Se sintetizó un cebador 341K en el caso de KM341-1-19, cebador 2053KBgl en el caso de 2105, cebador 110KBgl en el caso de 110 y 115, cebador 281KBgl en el caso de KM281-1-10, 4D11KBgl en el caso de 4D11, cebador 643KBgl en el caso de KM643-4-11, cebador lamda en 5' en el caso de F4-465 y cebador F2-103K en el caso de F-103 y F5-77.

60 En el caso de 341-1-19, 110, 115, KM643-4-11, KM281-1-10, 4D11 y 2105, se amplificó el ADNc a partir del ADNc de 1ª hebra usando el cebador específico de cadenas ligeras y cebador hk6. Entonces se determinó la secuencia de ambas direcciones usando el producto amplificado como molde. Para F4-465, F2-103 y F5-77, se realizó subclonación en PCR-Script (Stratagene, Lajolla, CA) o PCR-Blunt (Invitrogene, Carlsbad, CA) para determinar la secuencia.

65

Cebador hk2: 5'-GTT GAA GCT CTT TGT GAC GGG CGA GC-3' (SEQ ID NO: 16)

Cebador hL2: 5'-TCT TCT CCA CGG TGC TCC CTT CAT-3' (SEQ ID NO: 17)

5 Cebador 341K: 5'-atatagatctGAACTGCTCAGTTAGGACCCAGAGG-3' (SEQ ID NO: 18)

2053KBgl: atatagatctCGCGGGGAAGGAGACTGCTCAGTT (SEQ ID NO: 19)

110KBgl: atatagatctAGTCAGACCCAGTCAGGACACAGC (SEQ ID NO: 20)

10 281KBgl: atatagatctGAGCTGCTCAGTTAGGACCCAGAGGG (SEQ ID NO: 21)

4D11KBgl: atatagatctTAAGCAAGTGTAACAACCTCAGAGTAC (SEQ ID NO: 22)

15 643KBgl: atatagatctGAGGAACTGCTCAGTTAGGACCCAGAGG (SEQ ID NO: 23)

Lamda en 5': -AACTCCAGATCTGCCTCAGGAAGCAGCATC (SEQ ID NO: 24)

F2-103K: aactccagatctagggaagcagtgtaac (SEQ ID NO: 25)

20 Cebador hk6: 5'-TGGCGGGAAGATGAAGACAGATGGTG-3' (SEQ ID NO: 26)

Se muestran respectivamente a continuación los ADN de 341-1-19 que codifican para regiones variables de cadena H y cadena L de longitud completa y las secuencias de aminoácidos de cadena H y cadena L.

25 El punto de inicio de la traducción del ADN de la cadena H es un codón ATG que comienza a partir de la 50ª adenina (A) desde el extremo 5' de SEQ ID NO: 27, y el codón de terminación es TGA que comienza a partir de la 1472ª timina (T). El límite de la región variable y la región constante del anticuerpo se ubica entre la 493ª adenina (A) y la 494ª guanina (G) desde el extremo 5'. En la secuencia de aminoácidos, la región variable de cadena H oscila entre el extremo N-terminal y el 148º residuo de serina (S) de SEQ ID NO: 28, y la región constante es de la 149ª alanina (A) y los siguientes residuos. Se predijo mediante un software de predicción de secuencia génica (Signal P ver. 2) que la secuencia señal de la cadena H oscila entre el extremo N-terminal y la 20ª serina (S) de SEQ ID NO: 28. Se cree que el extremo N-terminal de la proteína madura es la 21ª glutamina (Q) de SEQ ID NO: 28.

35 El punto de inicio de la traducción del ADN de la cadena L es un codón ATG que comienza a partir de la 29ª A desde el extremo 5' de SEQ ID NO: 29, y la región variable oscila entre el extremo 5' y la 400ª adenina (A). En la secuencia de aminoácidos, la región variable oscila entre el extremo N-terminal y la 124ª lisina (K) de SEQ ID NO: 30. El análisis del extremo N-terminal de la proteína de cadena L purificada reveló que la secuencia señal de la cadena L oscila entre el extremo N-terminal y la 20ª glicina (G) de SEQ ID NO: 30, y el extremo N-terminal de la proteína madura es el 21º ácido glutámico (E) de SEQ ID NO: 30.

Cadena H de 341-1-19 (SEQ ID NO: 27):

**GTCGACGCTGAATTCTGGCTGACCAGGGCAGCCACCAGAGCTCCAGACAA
TGTCTGTCTCCTTCCTCATCTTCCTGCCCGTGCTGGGCCTCCCATGGGGTGT
CCTGTACAGGTCCAACCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCT
CGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCA
ACAGTGCTACTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGACCTTGAGT
GGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATCGTGATTATGTAGGAT
CTGTGAAAAGTCGAATAATCATCAACCCAGACACATCCAACAACCAGTTCT
CCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTATATATTACTGTAC
AAGAGCACAGTGGCTGGGAGGGGATTACCCCTACTACTACAGTATGGACGT**

CTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCTTCAGCCTCCACCAAGGGCC
CATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAG
CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG
TCGTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCAGCTGT
CCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTC
CAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCA
GCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGC
CCACCGTGCCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCCTTCCCC
CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTG
CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGT
ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGA
GCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCA
GGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGC
CTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCG
AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGA
ACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCAC
ACCTCCCATGCTGGACTCAGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCAC
CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA
TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC
CGGGTAAATGAGGATCC

Secuencia de aminoácidos de la cadena H de 341-1-19 (SEQ ID NO: 28)

MSVSFLIFLPVLGLPWGVLSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSA
TWNWIRQSPSRDLEWLGRYYRSKWYRDYVGSVKSRIIINPDTSNNQFSLQL
NSVTPEDTAIYYCTRAQWLGGDYPIYYSMVWVGQTTVTVSSASTKGPSVF
PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPCPAPPVAG
5 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT

KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 K

Cadena L de 341-1-19 (SEQ ID NO: 29):

ACTGCTCAGTTAGGACCCAGAGGGAACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTC
 TCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGAC
 ACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTC
 CTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGA
 AACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCA
 CTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT
 CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGC
 5 AGCGTAGCAACACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGTACG

Secuencia de aminoácidos de la cadena L de 341-1-19 (SEQ ID NO: 30)

MEAPAQLLFLLLLWLPD TTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA
 WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC
 10 QQRSNTFGPGTKVDIKRT

Se muestran a continuación los ADN de 2105 que codifican para la región variable de cadena H y región variable de cadena L y las secuencias de aminoácidos de cadena H y cadena L.

15 El punto de inicio de la traducción del ADN de la cadena H es un codón ATG que comienza a partir de la 70ª adenina (A) desde el extremo 5' de SEQ ID NO: 31. El límite de la región variable y la región constante del anticuerpo se ubica entre la 495ª adenina (A) y la 496ª guanina (G) desde el extremo 5'. En la secuencia de aminoácidos, la región variable de cadena H oscila entre el extremo N-terminal y el 142º residuo de serina (S) de SEQ ID NO: 32, y la región constante es de la 149ª alanina (A) y los siguientes residuos. Se predijo mediante un software de predicción de secuencia génica (Signal P ver. 2) que la secuencia señal de la cadena H oscila entre el extremo N-terminal y la 19ª cisteína (C) de SEQ ID NO: 32. Se cree que el extremo N-terminal de la proteína madura es el 20º ácido glutámico (E) de SEQ ID NO: 32.

25 El punto de inicio de la traducción del ADN de la cadena L es un codón ATG que comienza a partir de la 28ª A desde el extremo 5' de SEQ ID NO: 33, y la región variable oscila entre el extremo 5' y la 405ª adenina (A). En la secuencia de aminoácidos, la región variable oscila entre el extremo N-terminal y la 126ª lisina (K) de SEQ ID NO: 34. Se predijo mediante un software de predicción de secuencia génica (Signal P ver. 2) que la secuencia señal de la cadena L oscila entre el extremo N-terminal y la 20ª glicina (G) de SEQ ID NO: 34. Se cree que el extremo N-terminal de la proteína madura es el 21º ácido glutámico (E) de SEQ ID NO: 34.

30 Cadena H de 2105 (SEQ ID NO: 31)

CTGAACACAGACCCGTCGACTCCCAGGTGTTTCCATTCAGTGATCAGCACT
 GAACACAGAGGACTCACCATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTTTCCTTTTG
 GCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGG
 AGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGG
 ATTCACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAA
 GGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGCTTGGTGCA
 TGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGA
 ACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGT
 ATTACTGTGCAAGAGATAGGCTATTTCCGGGAGTTAGGTACTACGGTATGGA
 CGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGG

Secuencia de aminoácidos de la cadena H de 2105 (SEQ ID NO: 32)

MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYA.
 5 MHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSLVHADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN
 SLRAEDTALYYCARDRLFRGVRYYGMDVWGQGTTVTVSSASTK

Cadena L de 2105 (SEQ ID NO: 33)

10 CTGCTCAGTTAGGACCCAGAGGGAACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCT
 CTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGAC
 ACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTC
 CTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGA
 AACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCA
 CTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT
 CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGC
 AGCGTAGCCACTGGCTCACTTTCGGCGGGGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
 CGTACGGTG

Secuencia de aminoácidos de la cadena L de 2105 (SEQ ID NO: 34)

MEAPAQLLFLLLLWLPD TTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA
 WYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGS GTDFTLTIS SLEPEDFAVYYC
 15 QQRSHWLTFGGG TKVEIKRTV

Se muestran respectivamente a continuación los ADN de 110 que codifican para la región variable de cadena H y región variable de cadena L y las secuencias de aminoácidos de la cadena H y la cadena L.

20 El punto de inicio de la traducción del ADN de la cadena H es un codón ATG que comienza a partir de la 60ª adenina (A) desde el extremo 5' de SEQ ID NO: 35. El límite de la región variable y la región constante del anticuerpo se ubica entre la 479ª adenina (A) y la 480ª guanina (G) desde el extremo 5'. En la secuencia de aminoácidos, la región variable de cadena H oscila entre el extremo N-terminal de SEQ ID NO: 36 y el 140º residuo de serina (S), y la

región constante es de la 141ª alanina (A) y los siguientes residuos. Se predijo mediante un software de predicción de secuencia génica (Signal P ver. 2) que la secuencia señal de la cadena H oscila entre el extremo N-terminal y la 19ª cisteína (C) de SEQ ID NO: 36. Se cree que el extremo N-terminal de la proteína madura es la 20ª glutamina (Q) de SEQ ID NO: 36.

5 El punto de inicio de la traducción del ADN de la cadena L es un codón ATG que comienza a partir de la 35ª A desde el extremo 5' de SEQ ID NO: 37, y la región variable oscila entre el extremo 5' y la 421ª adenina (A). En la secuencia de aminoácidos, la región variable oscila entre el extremo N-terminal y la 129ª lisina (K) de SEQ ID NO: 38. Se predijo mediante un software de predicción de secuencia génica (Signal P ver. 2) que la secuencia señal de la
10 cadena L oscila entre el extremo N-terminal y la 22ª cisteína (C) de SEQ ID NO: 38. Se cree que el extremo N-terminal de la proteína madura es la 23ª valina (V) de SEQ ID NO: 38.

Cadena H de 110 (SEQ ID NO: 35)

**CTGAACACAGACCCGTCGACTTCCATTCCGGTGATCAGCACTGAACACAGA
GGACTCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCTCGTTGCTCTTTTA
AGAGGTGTCCAGTGTCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGT
CCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATCACCTT
CAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGG
AGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTATTAATACTATGCAGACTC
CGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTA
TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGC
GAGAGAGGGCTACAATATTTGACTGGTTATTTTGGCTACTGGGGCCAGGG
15 AACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGG**

Secuencia de aminoácidos de la cadena H de 110 (SEQ ID NO: 36)

**MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG
MHWVRQAPGKLEWVAVIWYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN
20 SLRAEDTAVYYCAREGYNILTGYFGYWGQGLVTVSSASTK**

Cadena L de 110 (SEQ ID NO: 37)

**TCA CAGATCTAGTCAGACCCAGTCAGGACACAGCATGGACATGAGGGTCC
CCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTG
TCATCTGGATGACCCAGTCTCCATCCTTACTCTCTGCATCTACAGGAGACAG
AGTCACCATCAGTTGTCGGATGAGTCAGGGCATTAGCAGTGATTTAGCCTG
GTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTGAGCTCCTGATCTCTGCTGCATC
CACTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGA
CAGATTTCACTCTCACCATCAGCTGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAACTTA
TTACTGTCAACAGTATTATAGTTTTCCGTGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAA
GGTGGAAATCAAACGTACG**

25 Secuencia de aminoácidos de la cadena L de 110 (SEQ ID NO: 38)

**MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCVIWM TQSPSLLSASTGDRVTISCRMSQGISS
DLAWYQQKPGKAPPELLISAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFAT
YYCQQYYSFPWTFGQGTKVEIKRT**

5 Se muestran respectivamente a continuación los ADN de 115 que codifican para la región variable de cadena H y región variable de cadena L y las secuencias de aminoácidos de la cadena H y cadena L.

10 El punto de inicio de la traducción del ADN de la cadena H es un codón ATG que comienza a partir de la 60ª adenina (A) desde el extremo 5' de SEQ ID NO: 39. El límite de la región variable y la región constante del anticuerpo se ubica entre la 479ª adenina (A) y la 480ª guanina (G) desde el extremo 5'. En la secuencia de aminoácidos, la región variable de cadena H oscila entre el extremo N-terminal de SEQ ID NO: 40 y el 140º residuo de serina (S), y la región constante es de la 141ª alanina (A) y los siguientes residuos. Se predijo mediante un software de predicción de secuencia génica (Signal P ver. 2) que la secuencia señal de la cadena H oscila entre el extremo N-terminal y la 19ª cisteína (C) de SEQ ID NO: 40. Se cree que el extremo N-terminal de la proteína madura es la 20ª glutamina (Q) de SEQ ID NO: 40.

15 El punto de inicio de la traducción del ADN de la cadena L es un codón ATG que comienza a partir de la 35ª A desde el extremo 5' de SEQ ID NO: 41, y la región variable oscila entre el extremo 5' y la 421ª adenina (A). En la secuencia de aminoácidos, la región variable oscila entre el extremo N-terminal y la 129ª lisina (K) de SEQ ID NO: 42. Se predijo mediante un software de predicción de secuencia génica (Signal P ver. 2) que la secuencia señal de la cadena L oscila entre el extremo N-terminal y la 22ª cisteína (C) de SEQ ID NO: 42. Se cree que el extremo N-terminal de la proteína madura es la 23ª valina (V) de SEQ ID NO: 42.

Cadena H de 115 (SEQ ID NO: 39)

**CTGAACACAGACCCGTCGACTTCCATTCCGGTGATCAGCACTGAACACAGA
GGACTCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTA
AGAGGTGTCCAGTGTCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGT
CCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTT
CAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGG
AGTGGGTGGCAGTTATATGGAATGATGGAAGTATTAATACTATGCAGACTC
CGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTA
TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTACTACTGTGC
GAGAGAGGGCTACAATATTTTGACTGGTTATTTGGCTACTGGGGCCAGGG
25 AACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGG**

Secuencia de aminoácidos de la cadena H de 115 (SEQ ID NO: 40)

**MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG
MHWVRQAPGKGLEWVAVIWNDGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN
30 SLRAEDTAVYYCAREGYNILTGYFGYWGQGLVTVSSASTK**

Cadena L de 115 (SEQ ID NO: 41)

**TCACAGATCTAGTCAGACCCAGTCAGGACACAGCATGGACATGAGGGTCC
CCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTG
TCATCTGGATGACCCAGTCTCCATCCTTACTCTCTGCATCTACAGGAGACAG**

AGTCACCATCAGTTGTCGGATGAGTCAGGGCATTAGCAGTGATTAGCCTG
 GTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTGAGCTCCTGATCTCTGCTGCATC
 CACTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGA
 CAGATTTCACTCTCACCATCAGCTGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAACTTA
 TTA CTGTCAACAGTATTATAGTTTTCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAA
 GGTGGAAATCAAACGTACG

Secuencia de aminoácidos de la cadena L de 115 (SEQ ID NO: 42)

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCVIWMTQSPSLLSASTGDRVTISCRMSQGISS
 DLAWYQQKPGKAPELLISAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFAT
 5 YYCQQYYSPWTFGQGTKVEIKRT

Se muestran respectivamente a continuación los ADN de 281-1-10 que codifican para la región variable de cadena H y región variable de cadena L y las secuencias de aminoácidos de la cadena H y cadena L.

10 El punto de inicio de la traducción del ADN de la cadena H es un codón ATG que comienza a partir de la 52ª adenina (A) desde el extremo 5' de SEQ ID NO: 43. El límite de la región variable y la región constante del anticuerpo se ubica entre la 468ª adenina (A) y la 469ª guanina (G) desde el extremo 5'. En la secuencia de aminoácidos, la región variable de cadena H oscila entre el extremo N-terminal de SEQ ID NO: 44 y el 139º residuo de serina (S), y la región constante es de la 140ª alanina (A) y los siguientes residuos. Se predijo mediante un software de predicción de secuencia génica (Signal P ver. 2) que la secuencia señal de la cadena H oscila entre el extremo N-terminal y la 19ª serina (S) de SEQ ID NO: 44. Se cree que el extremo N-terminal de la proteína madura es la 20ª glutamina (Q) de SEQ ID NO: 44.

20 El punto de inicio de la traducción del ADN de la cadena L es un codón ATG que comienza a partir de la 41ª A desde el extremo 5' de SEQ ID NO: 45, y la región variable oscila entre el extremo 5' y la 424ª adenina (A). En la secuencia de aminoácidos, la región variable oscila entre el extremo N-terminal y la 128ª lisina (K) de SEQ ID NO: 46. Se predijo mediante un software de predicción de secuencia génica (Signal P ver. 2) que la secuencia señal de la cadena L oscila entre el extremo N-terminal y la 20ª glicina (G) de SEQ ID NO: 46. Se cree que el extremo N-terminal de la proteína madura es el 21º ácido glutámico (E) de SEQ ID NO: 46.

25 Cadena H de 281-1-10 (SEQ ID NO: 43)

CTGAACACAGACCCGTCGACTTTGAGAGTCCTGGACCTCCTGTGCAAGAA
 CATGAAACATCTGTGGTTCTTCCTTCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGT
 CCTGTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTT
 CGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTGGTT
 ACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATT
 GGGTATATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAATCCCTCCCTCAAGAGTC
 GAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGA
 ATTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTACTGTGCGAGAGCCCCCT
 TGCACGGTGACTACAAATGGTTCCACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC
 ACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGG

Secuencia de aminoácidos de la cadena H de 281-1-10 (SEQ ID NO: 44)

**MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISGY
WSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLNSVT
AADTAVYYCARAPLHGDKWFHPWGQGLVTVSSASTK**

5 Cadena L de 281-1-10 (SEQ ID NO: 45)

**TCACAGATCTGAGCTGCTCAGTTAGGACCCAGAGGGAACCATGGAAACCC
CAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATAACCACCGGAG
AAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA
GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAG
CCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTG
CATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCT
GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCA
GTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGATCACCTTCGGCCAAGGG
ACACGACTGGAGATCAAACGTACG**

10

Secuencia de aminoácidos de la cadena L de 281-1-10 (SEQ ID NO: 46)

**METPAQLLFLLLLWLPDITGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYL
AWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY
CQQYGSSPITFGQGRLEIKRT**

15 Se muestran respectivamente a continuación los ADN de 4D11 que codifican para la región variable de cadena H y región variable de cadena L y las secuencias de aminoácidos de la cadena H y cadena L.

20 El punto de inicio de la traducción del ADN de la cadena H es un codón ATG que comienza a partir de la 16ª adenina (A) desde el extremo 5' de SEQ ID NO: 47. El límite de la región variable y la región constante del anticuerpo se ubica entre la 456ª adenina (A) y la 457ª guanina (G) desde el extremo 5'. En la secuencia de aminoácidos, la región variable de cadena H oscila entre el extremo N-terminal de SEQ ID NO: 48 y el 147º residuo de serina (S), y la región constante es de la 148ª alanina (A) y los siguientes residuos. Se predijo mediante un software de predicción de secuencia génica (Signal P ver. 2) que la secuencia señal de la cadena H oscila entre el extremo N-terminal y la 26ª serina (S) de SEQ ID NO: 48. Se cree que el extremo N-terminal de la proteína madura es la 27ª glutamina (Q) de SEQ ID NO: 48.

25

30 El punto de inicio de la traducción del ADN de la cadena L es un codón ATG que comienza a partir de la 59ª A desde el extremo 5' de SEQ ID NO: 49, y la región variable oscila entre el extremo 5' y la 442ª adenina (A). En la secuencia de aminoácidos, la región variable oscila entre el extremo N-terminal y la 128ª lisina (K) de SEQ ID NO: 50. Se predijo mediante un software de predicción de secuencia génica (Signal P ver. 2) que la secuencia señal de la cadena L oscila entre el extremo N-terminal y la 22ª cisteína (C) de SEQ ID NO: 50. Se cree que el extremo N-terminal de la proteína madura es la 21ª alanina (A) de SEQ ID NO: 50.

30

Cadena H de 4D11 (SEQ ID NO: 47)

35

ATATGTCGACGAGTCATGGATCTCATGTGCAAGAAAATGAAGCACCTGTGG
TTCTTCCTCCTGCTGGTGGCGGCTCCCAGATGGGTCCTGTCCCAGCTGCAG
CTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTACTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCT
CACCTGCACTGTCTCTGGCGGCTCCATCAGCAGTCCTGGTTACTACGGGGG
CTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTA
TAAAAGTGGGAGCACCTACCACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCA
TATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGA
CCGCCGCAGACACGGCTGTGTATTACTGTACGAGACCTGTAGTACGATATTT
TGGGTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
CTAGC

Secuencia de aminoácidos de la cadena H de 4D11 (SEQ ID NO: 48)

MDLMCKKMKHLWFFLLLVAAPRWVLSQLQLQESGPGLLKPSETLSLTCTVSG
GSISSPGYYGGWIRQPPGKGLEWIGSIYKSGSTYHNPSLKSRTISVDTSKNQF
SLKLSSVTAADTAVYYCTRPVVRYFGWFDPWGQGLVTVSSAS

5

Cadena L de 4D11 (SEQ ID NO: 49)

AGATCTTAAGCAAGTGTAACAACCTCAGAGTACGCGGGGAGACCCACTCAG
GACACAGCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGC
TCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCT
CCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTC
AGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCT
CCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAATTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAA
GGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCC
TGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTAAGTTAATAGTTACCC
GACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTACG

10

Secuencia de aminoácidos de la cadena L de 4D11 (SEQ ID NO: 50)

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISS
ALAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT
YYCQQFNSYPTFGQGTKVEIKRT

15 Se muestran respectivamente a continuación los ADN de KM643-4-11 que codifican para la región variable de cadena H y región variable de cadena L y las secuencias de aminoácidos de la cadena H y cadena L.

El punto de inicio de la traducción del ADN de la cadena H es un codón ATG que comienza a partir de la 1ª adenina

5 (A) desde el extremo 5' de SEQ ID NO: 51. El límite de la región variable y la región constante del anticuerpo se ubica entre la 447ª adenina (A) y la 448ª guanina (G) desde el extremo 5'. En la secuencia de aminoácidos, la región variable de cadena H oscila entre el extremo N-terminal de SEQ ID NO: 52 y el 149º residuo de serina (S), y la región constante es de la 150ª alanina (A) y los siguientes residuos. Se predijo mediante un software de predicción de secuencia génica (Signal P ver. 2) que la secuencia señal de la cadena H oscila entre el extremo N-terminal y la 20ª serina (S) de SEQ ID NO: 52. Se cree que el extremo N-terminal de la proteína madura es la 21ª glutamina (Q) de SEQ ID NO: 52.

10 El punto de inicio de la traducción del ADN de la cadena L es un codón ATG que comienza a partir de la 38ª A desde el extremo 5' de SEQ ID NO: 53, y la región variable oscila entre el extremo 5' y la 409ª adenina (A). En la secuencia de aminoácidos, la región variable oscila entre el extremo N-terminal y la 124ª lisina (K) de SEQ ID NO: 54. Se predijo mediante un software de predicción de secuencia génica (Signal P ver. 2) que la secuencia señal de la cadena L oscila entre el extremo N-terminal y la 20ª glicina (G) de SEQ ID NO: 54. Se cree que el extremo N-terminal de la proteína madura es el 21º acido glutámico (E) de SEQ ID NO: 54.

15 Cadena H de KM643-4-11 (SEQ ID NO: 51)

**ATGTCTGTCTCCTTCCTCATCTTCCTGCCCGTGCTGGGCCTCCCATGGGGTG
TCCTGTCACAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCC
TCGCAGACCCTCTCATTACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGC
AACAGTGCTGCTTGGAAGTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGA
GTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAAAGATTATGCAGT
ATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTT
CTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTG
TGCAAGAGGGTATTACTATGGTTCGGGGAGCTATCCCTACTACTACCAAATG
GACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC**

20 Secuencia de aminoácidos de la cadena H de KM643-4-11 (SEQ ID NO: 52)

**MSVSFLIFLPVLGLPWGVLSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSA
AWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYKDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQL
NSVTPEDTAVYYCARGYYYGSGSYPIYYQMDVWGQGTITVTVSSAS**

25 Cadena L de KM643-4-11 (SEQ ID NO: 53)

AATTGAGGAACTGCTCAGTTAGGACCCAGAGGGGAACCATGGAAGCCCCAG
 CTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAAT
 TGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGTGC
 CACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTA
 CCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAA
 CAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG
 ACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTA
 CTGTCAGCAGCGTAGCAACACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCA
 AACGAAC

Secuencia de aminoácidos de la cadena L de KM643-4-11 (SEQ ID NO: 54)

MEAPAQLLFLLLLWLPD TTGEIVLTQSPATLSLSPGESATLSCRASQSVSSYLA
 5 WYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSDFTLTISSLEPEDFAVYYC
 QRSNTFGGGTKVEIKR

10 Se muestran respectivamente a continuación los ADN de F4-465 que codifican para la región variable de cadena H y región variable de cadena L y las secuencias de aminoácidos de la cadena H y cadena L.

15 El punto de inicio de la traducción del ADN de la cadena H es un codón ATG que comienza a partir de la 47ª adenina (A) desde el extremo 5' de SEQ ID NO: 55. El límite de la región variable y la región constante del anticuerpo se ubica entre la 484ª adenina (A) y la 445ª guanina (G) desde el extremo 5'. En la secuencia de aminoácidos, la región variable de cadena H oscila entre el extremo N-terminal de SEQ ID NO: 56 y el 146º residuo de serina (S), y la región constante es de la 147ª alanina (A) y los siguientes residuos. Se predijo mediante un software de predicción de secuencia génica (Signal P ver. 2) que la secuencia señal de la cadena H oscila entre el extremo N-terminal y la 19ª serina (S) de SEQ ID NO: 56. Se cree que el extremo N-terminal de la proteína madura es la 20ª glutamina (Q) de SEQ ID NO: 56.

20 El punto de inicio de la traducción del ADN de la cadena L es un codón ATG que comienza a partir de la 81ª A desde el extremo 5' de SEQ ID NO: 57, y la región variable oscila entre el extremo 5' y la 440ª (C). En la secuencia de aminoácidos, la región variable oscila entre el extremo N-terminal y la 120ª treonina (T) de SEQ ID NO: 58. Se predijo mediante un software de predicción de secuencia génica (Signal P ver. 2) que la secuencia señal de la cadena L oscila entre el extremo N-terminal y la 19ª alanina (G) de SEQ ID NO: 58. Se cree que el extremo N-terminal de la proteína madura es la 20ª serina (S) de SEQ ID NO: 58.

Cadena H de F4-465 (SEQ ID NO: 55)

CTGAACACAGACCCGTCGACTACGCGGGAGACCACAGCTCCACACCATGG
 ACTGGACCTGGAGGATCCTATTCTTGGTGGCAGCAGCAACAGGTGCCCACT
 CCCAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGCC
 30 TCAGTGAAGGTCCCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTAGCTATGCTA

TGAATTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGG
ATCAACACCAACACTGGGAACCCAACGTATGCCAGGGCTTCACAGGACG
GTTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGCAGATCAGC
AGCCTAAAGGCTGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGTAGTA
CCAGTTGCTATGAGGGTAACTCACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGC
CAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAA

Secuencia de aminoácidos de la cadena H de F4-465 (SEQ ID NO: 56)

MDWTWRILFLVAAATGAHSQVQLVQSGSELKKPGASVKVPCKASGYTFTSYA
MNWVRQAPGQGLEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS
5 SLKAEDTAVYYCAREVVPVAMRVTHYYYGMDVWGQTTVTVSSAST

Cadena L de F4-465 (SEQ ID NO: 57)

CTGGGTACGGTAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCACAGATCTGCCT
CAGGAAGCAGCATCGGAGGTGCCTCAGCCATGGCATGGATCCCTCTCTTCC
TCGGCGTCCTTGTTTACTGCACAGGATCCGTGGCCTCCTATGAGCTGACTC
AGCCACCCTCAGTGTCCGTGGCCCCAGGACAGACAGCCAGCATCACCTGT
TCTGGAGATAAATTGGGGGATAATTTACTTGCTGGTATCAGCAGAAGCCA
GGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCATCTTTCAGGATTGGAAGCGGGCGCCCAGGG
ATCCCTGCGCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGGAACACAGCCACTCTGACC
ATCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTGTCAGGCGTGG
GACATCAGCACTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT
CAGCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAG
CTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCG
GGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGG
AGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCC
AGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGGAAGTCCCACAGAAGCTA
CAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCC
CTACAGAATGTTTCATGAATTCAGATCCGTTAACGGTTACCAACTACCTAGAC
10 TGGATTCGTGACCAACATA

Secuencia de aminoácidos de la cadena L de F4-465 (SEQ ID NO: 58)

MAWIPLFLGLVLYCTGVSASYELTQPPSVSVAPGQTASITCSGDKLGDNFTCW
 YQQKPGQSPVLVIFQDWKRRPGIPARFSGSKSGNTATLTISGTQAMDEADYYC
 QAWDISTVVFVGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP
 GAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC
 QVTHEGSTVEKTVAPTECS

Se muestran respectivamente a continuación los ADN de F2-103 que codifican para la región variable de cadena H y región variable de cadena L y las secuencias de aminoácidos de la cadena H y cadena L.

5 El punto de inicio de la traducción del ADN de la cadena H es un codón ATG que comienza a partir de la 32ª adenina (A) desde el extremo 5' de SEQ ID NO: 59. El límite de la región variable y la región constante del anticuerpo se ubica entre la 463ª adenina (A) y la 464ª guanina (G) desde el extremo 5'. En la secuencia de aminoácidos, la región variable de cadena H oscila entre el extremo N-terminal de SEQ ID NO: 60 y el 144º residuo de serina (S), y la

10 región constante es de la 145ª alanina (A) y los siguientes residuos. Se predijo mediante un software de predicción de secuencia génica (Signal P ver. 2) que la secuencia señal de la cadena H oscila entre el extremo N-terminal y la 19ª cisteína (C) de SEQ ID NO: 60. Se cree que el extremo N-terminal de la proteína madura es el 20º ácido glutámico (E) de SEQ ID NO: 60.

15 El punto de inicio de la traducción del ADN de la cadena L es un codón ATG que comienza a partir de la 29ª A desde el extremo 5' de SEQ ID NO: 61, y la región variable oscila entre el extremo 5' y la 415ª adenina (A). En la secuencia de aminoácidos, la región variable oscila entre el extremo N-terminal y la 129ª lisina (K) de SEQ ID NO: 62. Se predijo mediante un software de predicción de secuencia génica (Signal P ver. 2) que la secuencia señal de la

20 cadena L oscila entre el extremo N-terminal y la 22ª cisteína (C) de SEQ ID NO: 62. Se cree que el extremo N-terminal de la proteína madura es el 23º Asp (D) de SEQ ID NO: 62.

Cadena H de F2-103 (SEQ ID NO: 59)

GCTGATCAGGACTGCACACAGAGAACTCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCT
 GGGTTTTCTTGTGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGG
 TGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCC
 TGTGCAGTCTCTGGATTACCTTCAGTACCTACTGGATGCACTGGGTCCGC
 CAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGTGTGGGTCTCACGTATTAATAGTGATGGG
 AGTAGCACAACCTACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGA
 GACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGA
 GGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGATAGAGTACTATGGATCGGGGA
 GTTATCCTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGT
 CTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCCTC
 CAAGAGCACCTCT

25 Secuencia de aminoácidos de la cadena H de F2-103 (SEQ ID NO: 60)

MEFGLSWVFLVAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSTYW
 MHWVRQAPGKGLVWVSRINSDGSSTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN
 SLRAEDTAVYYCARDRLVWIGELSYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPL
 APSSKSTS

Cadena L de F2-103 (SEQ ID NO: 61)

GGGGAGTCAGACCCAGTCAGGACACAGCATGGACATGAGGGTCCCCGCTC
 AGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCAGGTGCCAAATGTGACATCC
 AGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA
 CCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAACTGGTTGGCCTGGTATC
 AGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGCTCTATAAGGCATCTGGTT
 5 TAGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAA
 TTCACTCTCACCATCAACAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACT
 GCCAACAGTCTAATAGTTATTCGTGGACGTTTCGGCCACGGGACCAAGGTGG
 AAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA
 TGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTT
 CTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC
 GGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT
 ACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC
 AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA

Secuencia de aminoácidos de la cadena L de F2-103 (SEQ ID NO: 62)

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGAKCDIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQISIS
 WLAWYQQKPGKAPKLLLYKASGLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTINSLQPDDFA
 TYCYCQNSNSYSWTFHGHTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEK
 10 K VYACEVTHQGL

Se muestran respectivamente a continuación los ADN de F5-77 que codifican para la región variable de cadena H y región variable de cadena L y las secuencias de aminoácidos de la cadena H y cadena L.

15 El punto de inicio de la traducción del ADN de la cadena H es un codón ATG que comienza a partir de la 100ª adenina (A) desde el extremo 5' de SEQ ID NO: 63. El límite de la región variable y la región constante del anticuerpo se ubica entre la 528ª adenina (A) y la 529ª guanina (G) desde el extremo 5'. En la secuencia de aminoácidos, la región variable de cadena H oscila entre el extremo N-terminal de SEQ ID NO: 64 y el 143º residuo de serina (S), y la región constante es de la 144ª alanina (A) y los siguientes residuos. Se predijo mediante un software de predicción de secuencia génica (Signal P ver. 2) que la secuencia señal de la cadena H oscila entre el extremo N-terminal y la 19ª cisteína (C) de SEQ ID NO: 64. Se cree que el extremo N-terminal de la proteína madura es el 20º ácido glutámico (E) de SEQ ID NO: 64.

25 El punto de inicio de la traducción del ADN de la cadena L es un codón ATG que comienza a partir de la 59ª A desde el extremo 5' de SEQ ID NO: 65, y la región variable oscila entre el extremo 5' y la 445ª adenina (A). En la secuencia de aminoácidos, la región variable oscila entre el extremo N-terminal y la 129ª lisina (K) de SEQ ID NO: 66. Se predijo mediante un software de predicción de secuencia génica (Signal P ver. 2) que la secuencia señal de la cadena L oscila entre el extremo N-terminal y la 22ª cisteína (C) de SEQ ID NO: 66. Se cree que el extremo N-terminal de la proteína madura es el 23º Asp (D) de SEQ ID NO: 66.

30 Cadena H de F5-77 (SEQ ID NO: 63)

GGTCTATATAAGCAGAGCTGGGTACGTCCTCACATTCAGTGATCAGCACTG
AACACAGACCCGTCGACGGTGATCAGGACTGAACAGAGAGAACTCACCAT
GGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCA
GTGTGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGG
GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGC
CATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAG
CTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCC
GGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGA
ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGATGGG
GGGTACTATGGTTCGGGGAGTTATGGGTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGA
ACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC
CTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCC

Secuencia de aminoácidos de la cadena H de F5-77 (SEQ ID NO: 64)

5 MEFGLSWLFLVAILKGVQCEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM
SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL
RAEDTAVYYCAKDGGYYGSGSYGYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFP

10 Cadena L de F5-77 (SEQ ID NO: 65)

CAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGGGGGAGTCAGACCCAGTCA
 GGACACAGCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCT
 GCTCTGGTTCCCAGGTTCCAGATGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATC
 TTCCGTGTCTGGATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCGAG
 TCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAG
 CCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGGATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATC
 AAGGTTTCAGCGGCAGTGGATTTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG
 CCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCTAGCAGTTT
 CCCTCGGACATTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGTACGGTGG
 CTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG
 AACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA
 AGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGA
 GTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC
 CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA
 AGTCACCCATCAGGGCCTGA

Secuencia de aminoácidos de la cadena L de F5-77 (SEQ ID NO: 66)

MDMRVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSGSVGDRVITICRASQGISS
 WLAWYQQKPGKAPKLLIYAGSSLQSGVPSRFSGSGFGTDFTLTISSLQPEDFAT
 YYCQQASSFPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
 YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
 5 VYACEVTHQGL

[Ejemplo 18] Expresión de proteína de anticuerpo en célula animal

10 Se incorporó el fragmento de ADN obtenido anteriormente que contenía la región variable del anticuerpo en un vector apropiado tal como N5KG1 (IDEC Pharmaceuticals, patente estadounidense 6001358), preparando de ese modo un vector de expresión de anticuerpos. Como célula huésped para la expresión, por ejemplo, se usa apropiadamente CHO-Ras (Katakura Y., *et al.*, Cytotechnology, 31: 103-109, 1999). El vector puede introducirse en la célula huésped mediante, por ejemplo, electroporación. Se linealizaron aproximadamente 2 µg del vector de expresión de anticuerpos con una enzima de restricción. Se introdujo el gen en 4x10⁷ células CHO-Ras en
 15 condiciones de 350 V y 500 µF usando un electroporador de Bio-Rad, y entonces se inocularon en una placa de cultivo de 96 pocillos. Se añadió un fármaco correspondiente al marcador de selección del vector expresión, y se continuó cultivando. Cuando se observaron colonias, se seleccionaron líneas que expresaban anticuerpos mediante el método descrito en el ejemplo 4. Pueden purificarse anticuerpos de las células seleccionadas según el ejemplo 5.

20 [Ejemplo 19] Acción supresora de la producción de anticuerpos específicos de antígenos del anticuerpo antagonista frente a CD40

25 Se sensibilizaron ratones que tenían un antecedente genético por el cual eran homocigotos para CD40 alterado endógeno de ratón y albergaban un transgén de un gen de CD40 humano (Yasui. *et al.* Int. Immunol. 2002 vol 14: 319) mediante inyección intraperitoneal de 100 µg (en una cantidad de NP-CGG) de un complejo de conjugados de 4-hidroxi-3-nitrofenilacetil-γ-globulina de pollo (NP-CGG: distribuido por el profesor Hitoshi KIKUTANI, Research Institute for Microbial Diseases, Universidad de Osaka) y ARAM (ARAM: motivo de activación de reconocimiento de antígeno, *Antigen Recognition Activation Motif*). Se administraron 30 o 100 µg de cada anticuerpo monoclonal por

medio de la vena caudal inmediatamente antes de la sensibilización con antígeno. Se administraron 100 µg de anticuerpo de IgG4 humano anti-albúmina humana como control negativo. 7 días tras la sensibilización, se recogió sangre del plexo venoso orbital, y entonces se midieron las cantidades de anticuerpos de IgG1 e IgM específicos de NP en los sueros mediante el método de ELISA. Se realizó el método de ELISA añadiendo albúmina sérica bovina unida a NP (NP-BSA: 2,5 µg/ml) (50 µl/pocillo) a cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos para ELISA (Maxisorp, Nunc), incubando a 4°C y luego absorbiendo NP-BSA. A continuación, se desechó el sobrenadante, se añadió un reactivo de bloqueo (Super Block, Pierce) a cada pocillo, y entonces se realizó la incubación a temperatura ambiente para el bloqueo. Entonces se lavó cada pocillo 3 veces con un tampón fosfato que contenía Tween20 al 0,1% (PBS-T). Posteriormente, se añadió cada suero diluido con PBS-T que contenía BlockAce al 10% (50 µl/pocillo) a cada pocillo, seguido por incubación a 37°C durante 2 horas para la reacción. Se lavó la microplaca 3 veces con PBS-T. Se añadió (50 µl/pocillo) a cada pocillo una disolución preparada diluyendo 1.000 veces anticuerpos de cabra anti-IgG1 o IgM de ratón marcados con fosfatasa alcalina (COSMO BIO, 1070-04 o 1020-04) con PBS-T que contenía BlockAce al 10%, seguido por 2 horas de incubación a 37°C. A continuación, se lavó la microplaca 3 veces con PBS-T, se añadió una disolución de sustrato cromogénico (50 µl/pocillo, Sigma104, sustrato de fosfatasa) a cada pocillo, y entonces se midió la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm con un lector de microplacas. Las figuras 18 y 19 muestran los resultados. En las figuras, los ejes longitudinales indican valores obtenidos mediante conversión usando como unidad el suero diluido 10.000 veces en el caso de anticuerpo de IgG1, y el suero diluido 100 veces en el caso de anticuerpo de IgM. En este caso, se preparó el suero inyectando NP-CGG dos veces en ratones C57BL/6, recogiendo sangre de los ratones y reuniendo el suero. La administración de 100 µg de cada uno de los anticuerpos F4-465, 4D11 y KM281-1-10 suprimió fuertemente la producción de anticuerpos de IgG1 e IgM específicos de NP.

[Ejemplo 20] Supresión de la proliferación de células B de las amígdalas mediante anticuerpo antagonista frente a CD40

Se obtuvieron amígdalas humanas del Children's Hospital (San Diego, California, EE.UU.). Se cortaron las amígdalas en trozos pequeños, se trituraron y entonces se hicieron pasar a través de un filtro celular de malla de nailon de 70 micrómetros, preparando de ese modo una suspensión celular. Se lavó la suspensión celular varias veces con PBS, se contó el número de células y entonces se crioconservó la suspensión con el 90% de suero humano (ICN) y el 10% de DMSO. Tras descongelar, se resuspendieron las células en un medio RPMI convencional complementado con suero humano al 10% y anfotericina 2,5 µg/ml (fangizon, Gibco/BRL), y entonces se usaron.

Se añadieron 1×10^5 células a una placa de 96 pocillos, y entonces se añadieron anticuerpos anti-CD40 humano a concentraciones de 0,01, 0,1, 1,0 y 10 µg/ml. Se realizó la prueba por triplicado a cada concentración. Se añadieron CD40L marcado con flag 1 µg/ml (Alexis) y anticuerpos potenciadores frente a CD40L 1 µg/ml (Alexis) a cada pocillo, seguido por 3 días de cultivo. Entonces, se añadió 1 µCi de [³H] timidina a cada pocillo. De 12 a 15 horas más tarde, se recogieron las células, y entonces se midió la proliferación de células B de las amígdalas usando un contador de centelleo líquido. Se determinó el recuento obtenido cuando habían proliferado células B debido a la estimulación de CD40L y no se había añadido anticuerpo como 100, y se determinó el recuento obtenido cuando no se había añadido CD40L y no se habían estimulado células B como 0. Por ejemplo, cuando el recuento relativo medido era de 30, se expresó esto en este experimento como que se había producido una inhibición de la proliferación del 70%.

5D12, que es el anticuerpo antagonista conocido, no mostró una inhibición de la proliferación de más del 50% incluso con la concentración de anticuerpo de 100 µg/ml. F4-465 mostró una supresión de la proliferación de aproximadamente el 80% incluso con la concentración de anticuerpo tan baja como 0,01 µg/ml, y mostró una supresión de la proliferación de aproximadamente el 95% con una concentración de anticuerpo de 0,1 a 10 µg/ml (figura 20).

Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona un anticuerpo contra CD40. El anticuerpo de la presente invención incluye tanto un anticuerpo que actúa de manera agonista sobre CD40 como un anticuerpo que actúa de manera antagonista sobre CD40. Por tanto, estos anticuerpos son útiles como, por ejemplo, agente inmunopotenciador y agente inmunosupresor, respectivamente.

Texto libre de lista de secuencias

SEQ ID NO: 1: ADN sintético

60 SEQ ID NO: 2: ADN sintético

SEQ ID NO: 3: ADN sintético

65 SEQ ID NO: 4: ADN sintético

- SEQ ID NO: 5: ADN sintético
- SEQ ID NO: 6: ADN sintético
- 5 SEQ ID NO: 7: ADN sintético
- SEQ ID NO: 8: ADN sintético
- 10 SEQ ID NO: 9: ADN sintético
- SEQ ID NO: 10: ADN sintético
- SEQ ID NO: 11: ADN sintético
- 15 SEQ ID NO: 12: ADN sintético
- SEQ ID NO: 13: ADN sintético
- 20 SEQ ID NO: 14: ADN sintético
- SEQ ID NO: 15: ADN sintético
- SEQ ID NO: 16: ADN sintético
- 25 SEQ ID NO: 17: ADN sintético
- SEQ ID NO: 18: ADN sintético
- 30 SEQ ID NO: 19: ADN sintético
- SEQ ID NO: 20: ADN sintético
- SEQ ID NO: 21: ADN sintético
- 35 SEQ ID NO: 22: ADN sintético
- SEQ ID NO: 23: ADN sintético
- 40 SEQ ID NO: 24: ADN sintético
- SEQ ID NO: 25: ADN sintético
- SEQ ID NO: 26: ADN sintético
- 45 **Lista de secuencias**
- <110> KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA
- 50 <120> ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-CD40
- <130> PH-1569-PCT
- <140>
- <141>
- 55 <150> Documento PCT/US01/13672
- <151> 27-04-2001
- 60 <150> Documento US09/844.684
- <151> 27-04-2001
- <150> Documento JP2001/142482
- <151> 11-05-2001
- 65 <150> Documento JP2001/310535
- <151> 05-10-2001

<150> Documento US10/040.244
 <151> 26-10-2001

5 <160> 66
 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
 10 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 15 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

<400> 1
 cccagatctg tccatccaga accaccact gcatgcagag 40

<210> 2
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

<400> 2
 30 acaagatctg ggctctacgt atctcagccg atcctgggga c 41

<210> 3
 <211> 27
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

40 <400> 3
 ggtccgggag atcatgaggg tgcctt 27

<210> 4
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

<400> 4

55 gtcacgccg ctggcaggg cgctg 26

<210> 5
 <211> 25
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

65 <400> 5

	gctggagggc acggtcacca cgctg	25
	<210> 6	
	<211> 23	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 6	
	ggtgccaggg ggaagaccga tgg	23
15	<210> 7	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 7	
25	atatgtcgac gctgaattct ggctgaccag ggcag	35
	<210> 8	
	<211> 37	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
35	<400> 8	
	atatgtcgac tccagggtgt ttccattcag tgatcag	37
40	<210> 9	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 9	
50	atatgtcgac ttccattcgg tgatcagcac tgaacac	37
	<210> 10	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 10	
60	atatgtcgac ttgagagtc ctggacctcc tgtg	34
	<210> 11	
	<211> 33	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
5	<400> 11	
	atatgtcgac gagtcatgga tctcatgtgc aag	33
	<210> 12	
10	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 12	
	atatgtcgac ccagggcagt caccagagct ccagac	36
20	<210> 13	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 13	
30	accgtgtcga ctacgcgga gtgact	26
	<210> 14	
	<211> 29	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
40	<400> 14	
	accgtgtcga cgctgatcag gactgcaca	29
45	<210> 15	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 15	
55	accgtgtcga cgggatcag gactgaacag	30
	<210> 16	
	<211> 26	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
65	<400> 16	

	gttgaagctc ttgtgacgg gcgagc	26
	<210> 17	
	<211> 24	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 17	
	tcttctccac ggtgctccct tcat	24
15	<210> 18	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 18	
25	atatagatct gaactgctca gtaggaccc agagg	35
	<210> 19	
	<211> 34	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
35	<400> 19	
	atatagatct cgcggggaag gagactgctc agtt	34
	<210> 20	
40	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 20	
50	atatagatct agtcagaccc agtcaggaca cagc	34
	<210> 21	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 21	
60	atatagatct gagctgctca gtaggaccc agaggg	36
	<210> 22	
	<211> 36	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
5	<400> 22	
	atatagatct taagcaagtg taacaactca gagtac	36
	<210> 23	
10	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 23	
	atatagatct gaggaactgc tcagtagga cccagagg	38
20	<210> 24	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 24	
30	aactccagat ctgcctcagg aagcagcatc	30
	<210> 25	
	<211> 30	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
40	<400> 25	
	aactccagat ctagggcaag cagtggtaac	30
45	<210> 26	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 26	
55	tggcgggaag atgaagacag atggtg	26
	<210> 27	
	<211> 1480	
	<212> ADN	
60	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 27	

```

gtcgacgctg aattctggct gaccagggca gccaccagag ctccagacaa tgtctgtctc 60
cttcctcate ttctgccccg tgctgggcct cccatggggt gtcctgtcac aggtccaact 120
gcagcagtcg ggtccaggac tggatgaagc ctgcagacc ctctcactca cctgtgccat 180
ctccgggggac agtgtctcta gcaacagtgc tacttggaac tggatcaggc agtccccatc 240
gagagacctt gagtggctgg gaaggacata ctacaggtcc aagtggatc gtgattatgt 300
aggatctgtg aaaagtcgaa taatcatcaa cccagacaca tccaacaacc agttctccct 360
gcagctgaac tctgtgactc ccgaggacac ggctatatat tactgtacaa gagcacagtg 420
gctggggagg gattaccctt actactacag tatggacgtc tggggccaag ggaccacggg 480
cacctctctt tcagcctcca ccaagggcc atcggctctt cccctggcgc cctgctccag 540
gagcacctcc gagagcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc 600
ggtgacggtg tcgtggaact caggcgtctt gaccagcggc gtgcacacct tcccagctgt 660
cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcaactt 720
cggcaccag acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa 780
gacagttgag cgcaaagtgt gtgtcgagt cccaccgtgc ccagcaccaac ctgtggcagg 840
accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc 900
tgaggtcagc tgcgtggagg tggacgtgag ccacgaagac cccgaggctc agttcaactg 960
gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccacgggagg agcagttcaa 1020
cagcacgttc cgtgtggta gcgtcctcac cgttgtgcac caggactggc tgaacggcaa 1080
ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc 1140
caaaacaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga 1200
gatgaccaag aaccaggta gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat 1260
cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cacctccat 1320
gctggactca gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg 1380
gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac 1440
gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atgaggatcc 1480

```

- <210> 28
- <211> 474
- 5 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 28

Met Ser Val Ser Phe Leu Ile Phe Leu Pro Val Leu Gly Leu Pro Trp
 1 5 10 15

Gly Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val
 20 25 30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser
 35 40 45

Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser
 50 55 60

Arg Asp Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr
 65 70 75 80

Arg Asp Tyr Val Gly Ser Val Lys Ser Arg Ile Ile Ile Asn Pro Asp
 85 90 95

Thr Ser Asn Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu
 100 105 110

Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Thr Arg Ala Gln Trp Leu Gly Gly Asp
 115 120 125

Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 130 135 140

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 145 150 155 160

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 165 170 175

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 180 185 190

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 195 200 205

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe
 210 215 220

Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
 225 230 235 240

Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
 245 250 255

Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 260 265 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 275 280 285

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 290 295 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 305 310 315 320

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val
 325 330 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 340 345 350

Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
 355 360 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 370 375 380

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 420 425 430

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 29
 <211> 406
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 29

actgctcagt taggaccag aggaaccat ggaagccca gctcagcttc tcttctcct 60
 gctactctgg ctcccagata ccaccggaga aattgtgttg acacagtctc cagccaccct 120
 gtctttgtct ccaggggaaa gagccaccct ctctgcagg gccagtcaga gtgtagcag 180
 ctacttagcc tggtagcaac agaaacctgg ccaggctccc aggctcctca tctatgatgc 240
 atccaacagg gccactggca tcccagccag gttcagtggc agtgggtctg ggacagactt 300
 cactctcacc atcagcagcc tagagcctga agattttgca gtttattact gtcagcagcg 360
 tagcaacact ttcggccctg ggaccaaagt ggatatcaaa cgtacg 406

10

<210> 30
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 30

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

	20		25		30
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	35		40		45
Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	50		55		60
Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Val His Ala	65		70		75
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn		85		90	95
Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu		100		105	110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Leu Phe Arg Gly Val Arg Tyr Tyr Gly		115		120	125
Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser		130		135	140
Thr Lys					
145					

5 <210> 33
 <211> 414
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 33

ctgctcagtt	aggaccacaga	gggaaccatg	gaagccccag	ctcagcttct	cttcctcctg	60
ctactctggc	tcccagatac	caccggagaa	attgtgtga	cacagtctcc	agccaccctg	120
tctttgtctc	caggggaaag	agccaccctc	tctgtcaggg	ccagtcagag	tgtagcagc	180
tacttagcct	ggtaccaaca	gaaacctggc	caggctccca	ggctcctcat	ctatgatgca	240
tccaacaggg	ccactggcat	cccagccagg	ttcagtgcca	gtgggtctgg	gacagacttc	300
actctacca	tcagcagcct	agagcctgaa	gattttgcag	tttattactg	tcagcagcgt	360
agccactggc	tcactttcgg	cggggggacc	aaggtggaga	tcaaactgac	ggtg	414

10
 15 <210> 34
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 34

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
 100 105 110

His Trp Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 115 120 125

Val

5

<210> 35
 <211> 493
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 35

ctgaacacag acccgtcgac ttccattcgg tgatcagcac tgaacacaga ggactcacca 60
 tggagtttgg gctgagctgg gttttcctcg ttgctctttt aagagggtgc cagtgtcagg 120

tgcagctggt ggagtctggg ggaggcgtgg tccagcctgg gaggtccctg agactctcct 180
 gtgcagcgtc tggattcacc ttcagtagct atggcatgca ctgggtccgc caggctccag 240
 gcaaggggct ggagtgggtg gcagttatat ggtatgatgg aagtattaa tactatgcag 300
 actccgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaattc caagaacacg ctgtatctgc 360
 aatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ctgtgtatta ctgtgcgaga gagggtaca 420
 atatattgac tggttatttt ggctactggg gccagggaac cctggtcacc gtctcctcag 480
 ctagcaccaa ggg 493

<210> 36
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 36

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

10

<210> 37
 <211> 427
 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 37

```

tcacagatct agtcagaccc agtcaggaca cagcatggac atgaggggcc cgcctcagct 60
cctggggctc ctgctgctct ggctcccagg tgccagatgt gtcactctgga tgaccacagtc 120
tccatcctta ctctctgcat ctacaggaga cagagtcacc atcagttgtc ggatgagtca 180
gggcattagc agtgatttag cctgggtatca gcaaaaacca gggaaagccc ctgagctcct 240
gatctctgct gcatccactt tgcaaagtgg ggtcccatca aggttcagtg gcagtggatc 300
tgggacagat ttaactctca ccatcagctg cctgcagctc gaagattttg caacttatta 360
ctgtcaacag tattatagtt ttccgtggac gttcggccaa gggaccaagg tggaaatcaa 420
acgtacg                                         427
    
```

5

<210> 38

<211> 131

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 38

```

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
  1           5           10           15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Val Ile Trp Met Thr Gln Ser Pro Ser Leu
           20           25           30

Leu Ser Ala Ser Thr Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Met Ser
           35           40           45

Gln Gly Ile Ser Ser Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
           50           55           60

Ala Pro Glu Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val
           65           70           75           80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
           85           90           95

Ile Ser Cys Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
    
```


50		55		60											
Glu	Trp	Val	Ala	Val	Ile	Trp	Asn	Asp	Gly	Ser	Ile	Lys	Tyr	Tyr	Ala
65					70					75					80
Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn
			85						90					95	
Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Gly	Tyr	Asn	Ile	Leu	Thr	Gly	Tyr	Phe	Gly
		115					120					125			
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys
	130					135					140				

<210> 41
 <211> 427
 5 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 41

```

tcacagatct agtcagaccc agtcaggaca cagcatggac atgagggtcc ccgctcagct 60
cctggggctc ctgctgctct ggctcccagg tgccagatgt gtcacttggg tgaccagctc 120
tccatcctta ctctctgcat ctacaggaga cagagtcacc atcagttgtc ggatgagtcg 180
gggcattagc agtgatttag cctgggtatca gcaaaaacca gggaaagccc ctgagctcct 240
gatctctgct gcatccactt tgcaaagtgg ggtcccatca aggttcagtg gcagtgatc 300
tgggacagat ttcactctca ccatcagctg cctgcagtct gaagattttg caacttatta 360
ctgtcaacag tattatagtt ttccgtggac gttcggccaa gggaccaagg tggaaatcaa 420
acgtacg 427
    
```

<210> 42
 <211> 131
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 42

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1	5	10	15
Leu Pro Gly Ala Arg Cys Val Ile Trp Met Thr Gln Ser Pro Ser Leu			
	20	25	30
Leu Ser Ala Ser Thr Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Met Ser			
	35	40	45
Gln Gly Ile Ser Ser Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys			
	50	55	60
Ala Pro Glu Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val			
	65	70	75
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
	85	90	95
Ile Ser Cys Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln			
	100	105	110
Tyr Tyr Ser Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile			
	115	120	125
Lys Arg Thr			
	130		

<210> 43
 <211> 481
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 43

```

ctgaacacag acccgtcgac tttgagagtc ctggacctcc tgtgcaagaa catgaaacat 60
ctgtggttct tccttctcct ggtggcagct cccagatggg tcctgtccca ggtgcagctg 120
caggagtcgg gcccaggact ggtgaagcct tcggagacct tgccctcac ctgcactgtc 180
tctggtggct ccatcagtgg ttactactgg agctggatcc ggcagcccc agggaaggga 240
ctggagtgga ttgggtatat ctattacagt gggagcacca actacaatcc ctccctcaag 300
agtcgagtca ccatatcagt agacacgtcc aagaaccagt tctccctgaa gctgaattct 360
gtgaccgctg cggacacggc cgtgtattac tgtgagagag ccccttgca cggtgactac 420
aatggttcc acccctgggg ccaggaacc ctggtcaccg tctcctcagc tagcaccaag 480
g                                                                                   481
    
```

10

<210> 44
 <211> 143

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 44

5

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
 35 40 45

Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Leu His Gly Asp Tyr Lys Trp Phe His Pro
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

<210> 45
 <211> 430
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 45

```

tcacagatct gagctgctca gtaggaccc agaggaacc atggaaacc cagcgcagct 60
tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga gaaattgtgt tgacgcagtc 120
tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc ctctcctgca gggccagtca 180
gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa cctggccagg ctcccaggct 240
cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatcca gacaggttca gtggcagtgg 300
gtctgggaca gacttactc tcaccatcag cagactggag cctgaagatt ttgcagtgta 360
ttactgtcag cagtatggta gctcaccgat caccttcggc caagggacac gactggagat 420
caaacgtacg                                     430
    
```

<210> 46
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 46

```

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
  1                   5                   10                   15
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
                   20                   25                   30
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
                   35                   40                   45
Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
  50                   55                   60
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
  65                   70                   75                   80
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
                   85                   90                   95
Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
                   100                  105                  110
Gly Ser Ser Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
                   115                  120                  125
Arg Thr
  130
    
```

10

<210> 47

ES 2 491 265 T3

<211> 462
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 47

```

atgatgctgac gagtcatgga tctcatgtgc aagaaaatga agcacctgtg gttcttcctc 60
ctgctgggtgg cggctcccag atgggtcctg tcccagctgc agctgcagga gtcgggcca 120
ggactactga agccttcgga gaccctgtcc ctcacctgca ctgtctctgg cggctccatc 180
agcagtcctg gttactacgg gggctggatc cgccagcccc cagggaaggg gctggagtgg 240
attgggagta tctataaaag tgggagcacc taccacaacc cgtccctcaa gagtcgagtc 300
accatatccg tagacacgtc caagaaccag ttctccctga agctgagctc tgtgaccgcc 360
gcagacacgg ctgtgtatta ctgtacgaga cctgtagtac gatattttgg gtggttcgac 420
ccctgggggcc agggaaccct ggtcaccgtc tcctcagcta gc 462
  
```

10 <210> 48
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 48

```

Met Asp Leu Met Cys Lys Lys Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu
  1          5          10          15

Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu
          20          25          30

Ser Gly Pro Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys
          35          40          45

Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Pro Gly Tyr Tyr Gly Gly Trp
  50          55          60

Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr
  65          70          75          80

Lys Ser Gly Ser Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr
          85          90          95
  
```

Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser
 100 105 110

Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Pro Val Val
 115 120 125

Arg Tyr Phe Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 130 135 140

Val Ser Ser Ala Ser
 145

<210> 49
 <211> 448
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 49

agatcctaag caagtgtaac aactcagagt acgcggggag acccactcag gacacagcat 60
 ggacatgagg gtccccgctc agctcctggg gcttctgctg ctctggctcc caggtgccag 120
 atgtgccatc cagttgacct agtctccatc ctccctgtct gcatctgtag gagacagagt 180
 caccatcact tgccgggcaa gtcagggcat tagcagtgct ttagcctggt atcagcagaa 240
 accagggaaa gtcctaaagc tcctgatcta tgatgcctcc aatttgaaa gtgggggtccc 300
 atcaaggttc agcggcagtg gatctgggac agatttact ctcaccatca gcagcctgca 360
 gcctgaagat tttgcaactt attactgtca acagtttaat agttaccga cgttcggcca 420
 agggaccaag gtggaaatca aacgtacg 448

10

<210> 50
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 50

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

	35		40		45														
Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Ala	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys				
	50					55					60								
Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Val				
	65				70					75					80				
Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr				
				85					90					95					
Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln				
			100					105					110						
Phe	Asn	Ser	Tyr	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				
	115						120					125							
Arg	Thr																		
	130																		

<210> 51
 <211> 453
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 51

```

atgtctgtct ccttcctcat cttcctgccc gtgctgggcc tcccatgggg tgcctgtca 60
caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctgggtaagc cctcgcagac cctctcattc 120
acctgtgcca tctccgggga cagtgtctct agcaacagtg ctgcttgaa ctggatcagg 180
cagtcacctat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtgggat 240
aaagattatg cagtatctgt gaaaagtoga ataaccatca acccagacac atccaagaac 300
cagttctccc tgcagctgaa ctctgtgacc cccgaggaca cggctgtgta ttactgtgca 360
agaggggtatt actatgggtc ggggagctat ccctactact accaaatgga cgtctggggc 420
caagggacca cggtcacctg ctctcagct agc 453
    
```

10

<210> 52
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 52

Met Ser Val Ser Phe Leu Ile Phe Leu Pro Val Leu Gly Leu Pro Trp
 1 5 10 15

Gly Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val
 20 25 30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Phe Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser
 35 40 45

Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser
 50 55 60

Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr
 65 70 75 80

Lys Asp Tyr Ala Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp
 85 90 95

Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu
 100 105 110

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly
 115 120 125

Ser Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gln Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 130 135 140

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 145 150

<210> 53
 <211> 414
 5 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 53

aattgaggaa ctgctcagtt aggaccacaga gggaaccatg gaagccccag ctcagcttct 60
 ctctctctg ctactctggc tcccagatac caccggagaa attgtgttga cacagtctcc 120
 agccaccctg tctttgtctc caggggaaag tgccaccctc tcctgcaggg ccagtcagag 180
 10 tgtagcagc tacttagcct ggtaccaaca gaaacctggc caggctccca ggctctcat 240
 ctatgatgca tccaacaggg cactggcat cccagccagg ttcagtggca gtgggtctgg 300
 gacagacttc actctacca tcagcagcct agagcctgaa gattttgcag ttattactg 360
 tcagcagcgt agcaacactt tcggcggagg gaccaaggtg gagatcaaac gaac 414


```

ctgaacacag acccgtcgac tacgcgggag accacagctc cacaccatgg actggacctg 60
gaggatccta ttcttggtgg cagcagcaac aggtgcccac tcccagggtgc agctggtgca 120
atctgggtct gagttgaaga agcctggggc ctcagtgaag gtcccctgca aggcttctgg 180
atacaccttc actagctatg ctatgaattg ggtgcgacag gcccctggac aagggcttga 240
gtggatggga tggatcaaca ccaacactgg gaacccaacg tatgcccagg gcttcacagg 300
acggtttgtc ttctccttgg acacctctgt cagcacggca tatctgcaga tcagcagcct 360
aaaggctgag gacactgccg tgtattactg tgcgagagag gtagtaccag ttgctatgag 420
ggtaactcac tactactacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc 480
ctcagctagc accaa 495

```

<210> 56
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 56

```

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

```

10

130

135

140

Ser Ser Ala Ser Thr

145

<210> 57
 <211> 830
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 57

```

ctgggtacgg taaccgtcag atgccttggg gacgccatca cagatctgcc tcaggaagca 60
gcatcggagg tgcctcagcc atggcatgga tccctctctt cctcggcgtc cttgtttact 120
gcacaggatc cgtggcctcc tatgagctga ctcagccacc ctcagtgtcc gtggccccag 180
gacagacagc cagcatcacc tgttctggag ataaattggg ggataatttt acttgctggt 240
atcagcagaa gccaggccag tcccctgtgc tggatcatctt tcaggattgg aagcggcgcc 300
cagggatccc tgcgcgattc tctggctcca agtctgggaa cacagccact ctgaccatca 360
gcgggaccca ggctatggat gaggctgact attactgtca ggcgtgggac atcagcactg 420
tggatattcgg cggaggggacc aagctgaccg tcctagggtca gcccaaggct gccccctcgg 480
tcactctgtt cccgccctcc tctgaggagc ttcaagccaa caaggccaca ctgggtgtgc 540
tcataagtga cttctacccg ggagccgtga cagtggcctg gaaggcagat agcagccccg 600
tcaaggcggg agtggagacc accacaccct ccaaacaag caacaacaag tacgcggcca 660
gcagctacct gagcctgacg cctgagcagt ggaagtcca cagaagctac agctgccagg 720
tcacgcatga agggagcacc gtggagaaga cagtggcccc tacagaatgt tcatgaattc 780
agatccgtta acggttacca actacctaga ctggattcgt gaccaacata 830
    
```

10

<210> 58
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 58

```

Met Ala Trp Ile Pro Leu Phe Leu Gly Val Leu Val Tyr Cys Thr Gly
  1           5           10           15

Ser Val Ala Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala
           20           25           30

Pro Gly Gln Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp
           35           40           45
    
```

Asn Phe Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu
 50 55 60

Val Ile Phe Gln Asp Trp Lys Arg Arg Pro Gly Ile Pro Ala Arg Phe
 65 70 75 80

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr
 85 90 95

Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ile Ser
 100 105 110

Thr Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 115 120 125

Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
 130 135 140

Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
 145 150 155 160

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
 165 170 175

Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
 180 185 190

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
 195 200 205

Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
 210 215 220

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 225 230

<210> 59
 <211> 520
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 59

```

gctgatcagg actgcacaca gagaactcac catggagttt gggctgagct gggttttcct 60
tgttgctatt ttaaaagggtg tccagtgtga ggtgcagctg gtggagtccg ggggaggctt 120
agttcagcct ggggggtccc tgagactctc ctgtgcagtc tctggattca cttcagtac 180
ctactggatg cactgggtcc gccaaagctcc agggaagggg ctggtgtggg tctcacgtat 240
taatagtgat gggagtagca caacctacgc ggactccgtg aagggccgat tcaccatctc 300
cagagacaac gccaaagaaca cgctgtatct gcaaatgaac agtctgagag ccgaggacac 360
ggctgtgtat tactgtgcaa gagatagagt actatggatc ggggagttat cctactacgg 420
tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc tcagctagca ccaagggccc 480
atcggctctc cccctggcac cctcctccaa gaccacctct 520

```

<210> 60
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 60

```

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
  1           5           10           15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
          20           25           30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe
          35           40           45

Ser Thr Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
  50           55           60

Val Trp Val Ser Arg Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Thr Tyr Ala
  65           70           75           80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
          85           90           95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
          100          105          110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Val Leu Trp Ile Gly Glu Leu Ser Tyr
          115          120          125

```

10

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 145 150 155 160

Ser Thr Ser

<210> 61
 <211> 698
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 61

ggggagtcag acccagtcag gacacagcat ggacatgagg gtccccgctc agctcctggg 60
 gctcctgctg ctctggctcc caggtgccaa atgtgacatc cagatgaccc agtctccttc 120
 caccctgtct gcatctgtag gagacagagt caccatcact tgccgggcca gtcagagtat 180
 tagtaactgg ttggcctggt atcagcagaa accagggaaa gcccctaagc tcctgctcta 240
 taaggcatct ggtttagaaa gtgggggtccc atcaaggttc agcggcagtg gatctgggac 300
 agaattcact ctcaccatca acagcctgca gcctgatgat ttgcaactt attactgcca 360
 acagtctaata agttattcgt ggacgttcgg ccacgggacc aaggtggaaa tcaaacgtac 420
 ggtggctgca ccatctgtct tcatcttccc gccatctgat gagcagttga aatctggaac 480
 tgcctctggt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga gaggccaaag tacagtggaa 540
 ggtggataac gccctcaat cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc aggacagcaa 600
 ggacagcacc tacagcctca gcagcacctt gacgctgagc aaagcagact acgagaaaca 660
 caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctga 698

10

<210> 62
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 62

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Lys Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Gln Ser Ile Ser Asn Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Leu Tyr Lys Ala Ser Gly Leu Glu Ser Gly Val
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Asn Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Ser Asn Ser Tyr Ser Trp Thr Phe Gly His Gly Thr Lys Val Glu Ile
 115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
 210 215 220

<210> 63

<211> 630

5 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 63

```

ggtctatata agcagagctg ggtacgtcct cacattcagt gatcagcact gaacacagac 60
ccgtcgacgg tgatcaggac tgaacagaga gaactcacca tggagtttgg gctgagctgg 120
ctttttcttg tggctatattt aaaaggtgtc cagtgtgagg tgcagctggt ggagtctggg 180
ggaggcttgg tacagcctgg ggggtccctg agactctcct gtgcagcctc tggattcaac 240
tttagcagct atgccatgag ctgggtccgc caggctccag ggaaggggct ggagtgggtc 300
tcagctatta gtggtagtgg tggtagcaca tactacgcag actccgtgaa gggccgggtc 360
accatctcca gagacaattc caagaacacg ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc 420
gaggacacgg ccgtatatta ctgtgcgaaa gatgggggggt actatgggtc ggggagttat 480
gggtactttg actactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcctcagc tagcaccaag 540
ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 600
ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc                                     630
    
```

<210> 64
 <211> 177
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 64

```

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
  1           5           10          15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
          20           25           30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
      35           40           45

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
  50           55           60

Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
  65           70           75           80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
          85           90           95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
          100          105          110
    
```

10

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Gly
 115 120 125

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 130 135 140

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 145 150 155 160

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 165 170 175

Pro

<210> 65
 <211> 728
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 65

caagcagtgg taacaacgca gactacgagg ggggagtcag acccagtcag gacacagcat 60
 ggacatgagg gtccccgctc agctcctggg gctcctgctg ctctggttcc caggttccag 120
 atgcgacatc cagatgacce agtctccatc ttccgtgtct ggatctgtag gagacagagt 180
 caccatcact tgtcgggcca gtcagggtat tagcagctgg ttagcctggg atcagcagaa 240
 accagggaaa gccctaagc tcctgatcta tgctggatcc agtttgcaa gtgggggtccc 300
 atcaaggttc agcggcagtg gatttgggac agatttcaact ctcaccatca gcagcctgca 360
 gcctgaagat tttgcaactt actattgtca acaggctagc agtttcctc ggacattcgg 420
 ccaagggacc aaggtggaga tcaaactgac ggtggctgca ccatctgtct tcattctccc 480
 gccatctgat gagcagttga aatctggaac tgcctctggt gtgtgcctgc tgaataactt 540
 ctatcccaga gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac gccctccaat cgggtaactc 600
 ccaggagagt gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagcacctc 660
 gacgctgagc aaagcagact acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca 720
 gggcctga 728

10

<210> 66
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 66

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Val Ser Gly Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Ala Ser Ser Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205

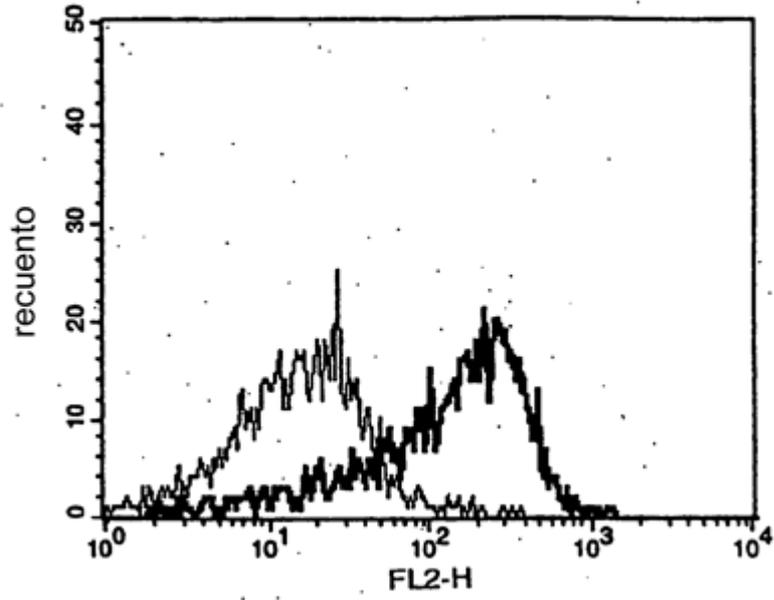
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
 210 215 220

REIVINDICACIONES

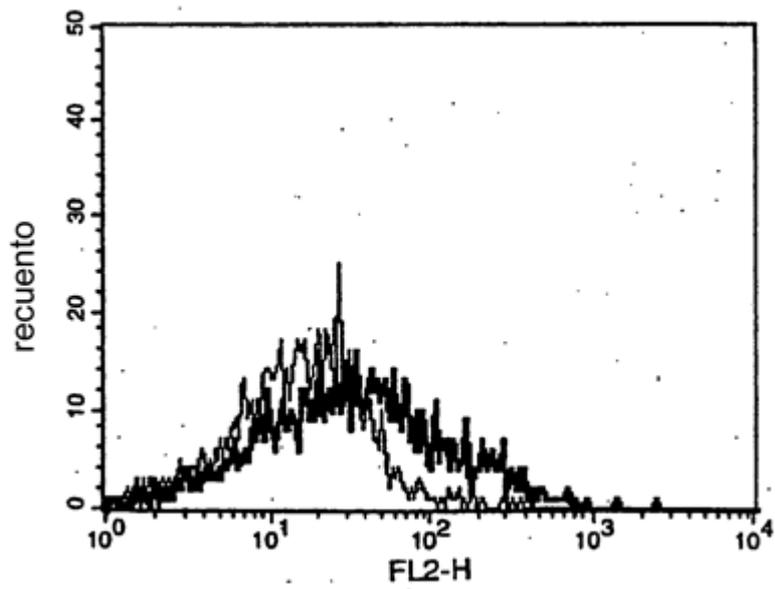
1. Anticuerpo o fragmento funcional del anticuerpo que se produce mediante el hibridoma KM341-1-19 (n.º de registro FERM BP-7759).
2. Anticuerpo o fragmento funcional del anticuerpo, que tiene secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo producido mediante el hibridoma KM341-1-19 (n.º de registro FERM BP-7759).
3. Anticuerpo o fragmento funcional del anticuerpo, que tiene secuencias de aminoácidos de las porciones maduras de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo producido mediante el hibridoma KM341-1-19 (n.º de registro FERM BP-7759), estando representadas la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera respectivamente por SEQ ID NO: 28 y 30.
4. Anticuerpo o fragmento funcional del anticuerpo, que tiene secuencias de aminoácidos de las porciones maduras de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo, estando representadas la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera respectivamente por SEQ ID NO: 28 y 30.
5. Anticuerpo o fragmento funcional del anticuerpo, que tiene secuencias de aminoácidos que oscilan respectivamente entre la 21ª Q y la 148ª S de SEQ ID NO: 28 y que oscilan entre el 21º E y la 124ª K de SEQ ID NO: 30.
6. Anticuerpo o fragmento funcional del anticuerpo, que tiene secuencias de aminoácidos de las porciones maduras de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, estando codificadas la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera respectivamente por secuencias de ácido nucleico aisladas a partir del hibridoma KM341-1-19 (n.º de registro FERM BP-7759).
7. Anticuerpo o fragmento funcional del anticuerpo, que tiene secuencias de aminoácidos que están codificadas respectivamente por secuencias de ácido nucleico que oscilan entre la 110ª C y la 493ª A de SEQ ID NO: 27 y que oscilan entre la 89ª G y la 400ª A de SEQ ID NO: 29.
8. Anticuerpo o fragmento funcional del anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que es un anticuerpo humano.
9. Composición farmacéutica que contiene como principio activo el anticuerpo del fragmento funcional del anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Agente inmunopotenciador, agente antitumoral o agente anti-enfermedad autoinmunitaria, que contiene como principio activo el anticuerpo o el fragmento funcional del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
11. Uso del anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento de pacientes que necesitan inmunopotenciación, para el tratamiento de tumores, o para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.
12. Hibridoma KM341-1-19 (n.º de registro FERM BP-7759).
13. Ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos de la porción madura de una región variable de cadena pesada aislada a partir del hibridoma KM341-1-19 (n.º de registro FERM BP-7759), en el que la región variable de cadena pesada está codificada por una secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 27.
14. Ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos de la porción madura de una región variable de cadena ligera aislada a partir del hibridoma KM341-1-19 (n.º de registro FERM BP-7759), en el que la región variable de cadena ligera está codificada por una secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 29.
15. Ácido nucleico según la reivindicación 13 ó 14, que es ARN o ADN.
16. Vector que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 13 ó 14.
17. Célula huésped que comprende el vector según la reivindicación 16.

18. Método de producción de un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo, que comprende cultivar la célula huésped que comprende un vector que tiene el ácido nucleico según la reivindicación 13 y el ácido nucleico según la reivindicación 14 y que expresa el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo.
- 5
19. Fragmento funcional según la reivindicación 2, que comprende una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo producido mediante el hibridoma KM341-1-19 (n.º de registro FERM BP-7759).
- 10
20. Fragmento funcional según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, que comprende las porciones maduras de una región variable de cadena pesada representada por SEQ ID NO: 28 o una región variable de cadena ligera representada por SEQ ID NO: 30.

Fig. 1



Anticuerpo KM302-1



Anticuerpo G28-5

Fig. 2A

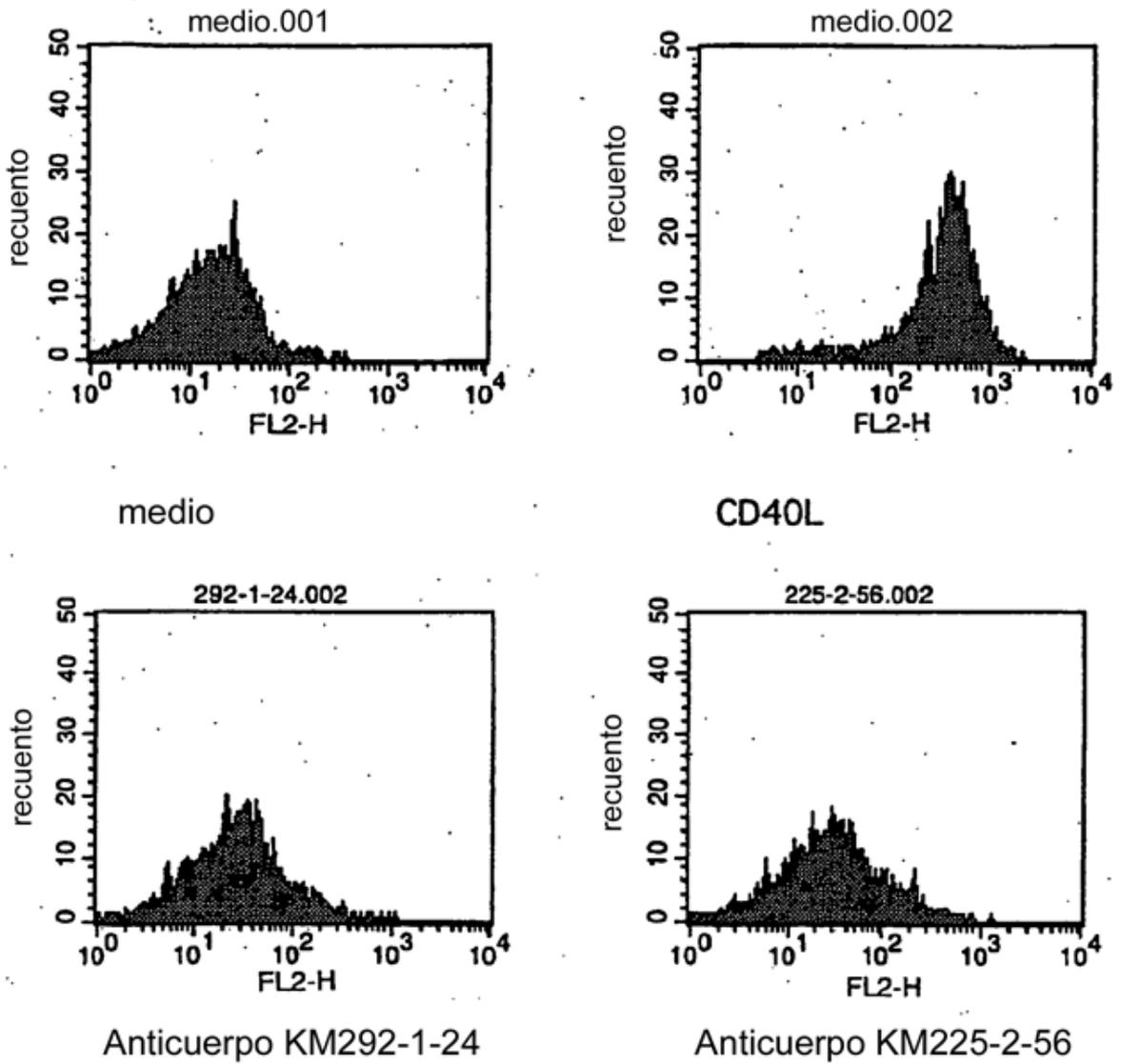
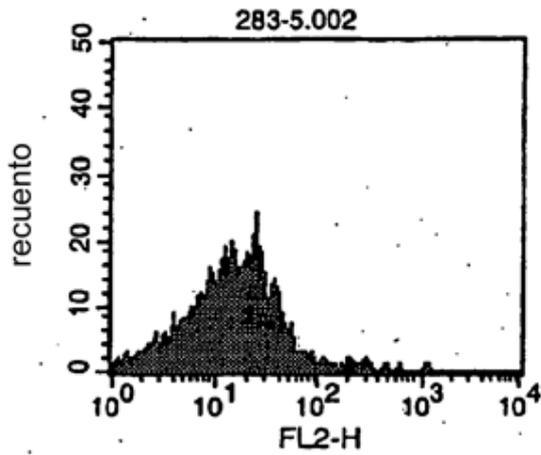
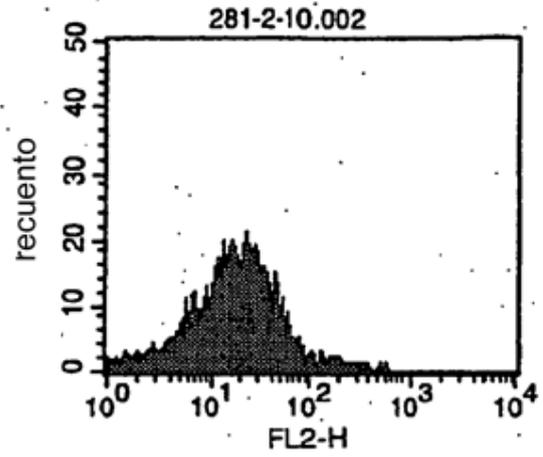


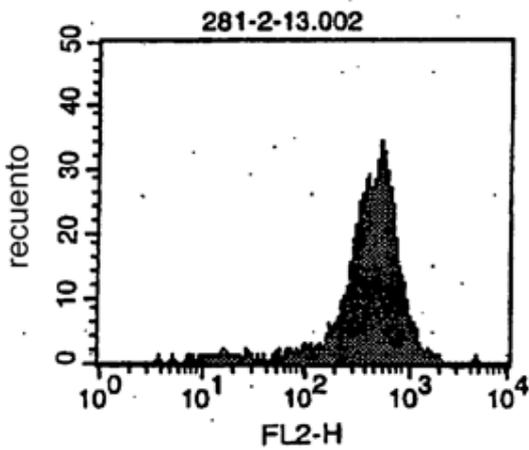
Fig. 2B



Anticuerpo KM283-5

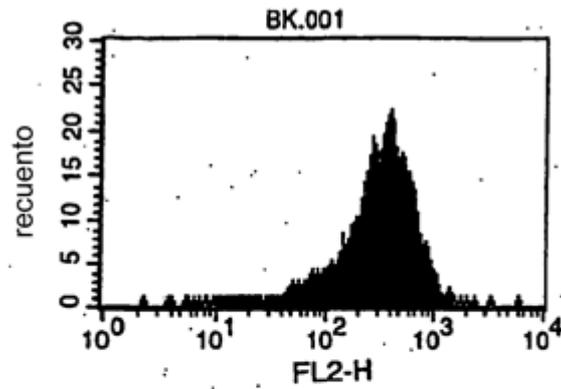


Anticuerpo KM281-2-10-1-2

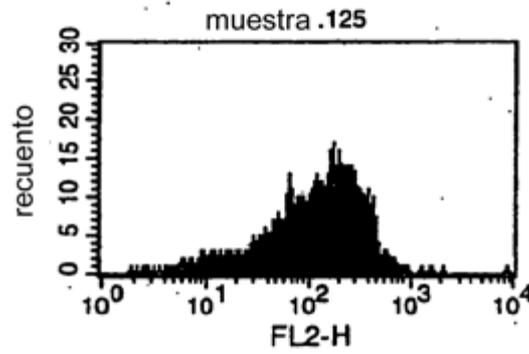


Anticuerpo KM281-2-13

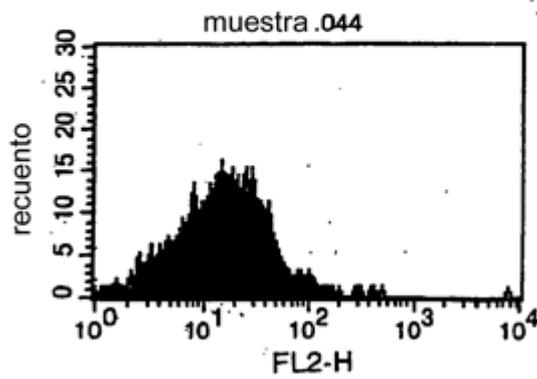
Fig. 3



CD40L sólo

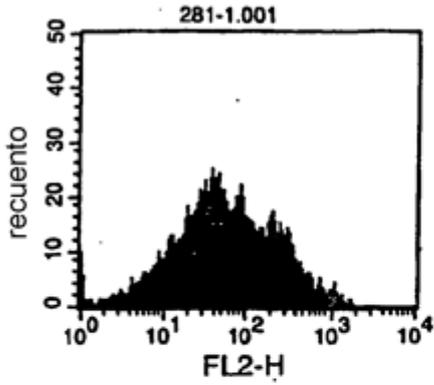


CD40L+5D12

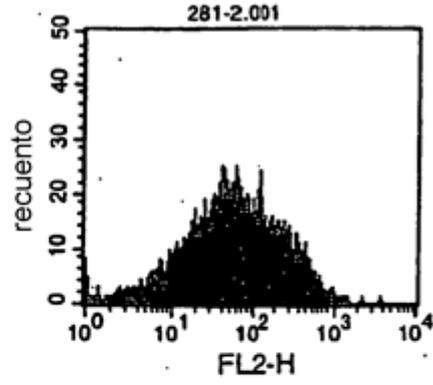


CD40L+ anticuerpo KM281-1-10

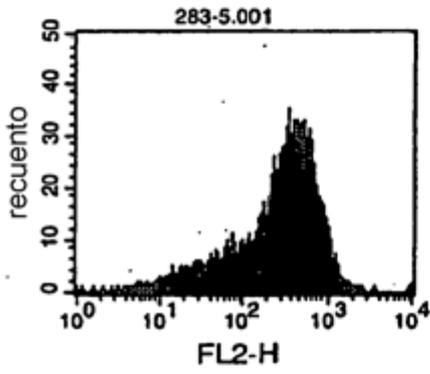
Fig. 4



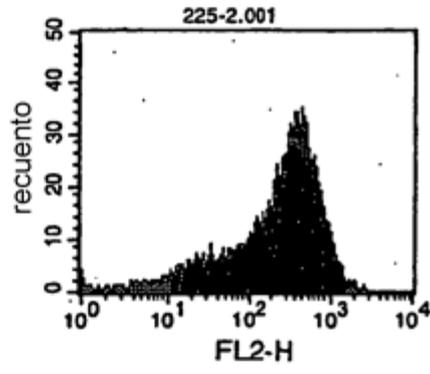
Anticuerpo KM281-1-10



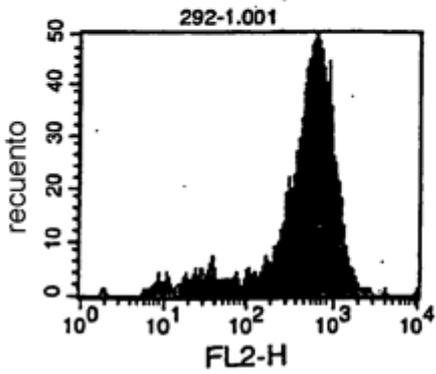
Anticuerpo KM281-2-10-1-2



Anticuerpo KM283-5

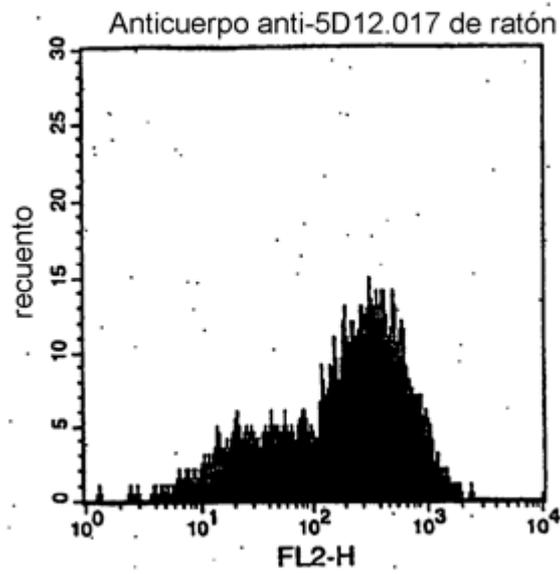


Anticuerpo KM225-2-56

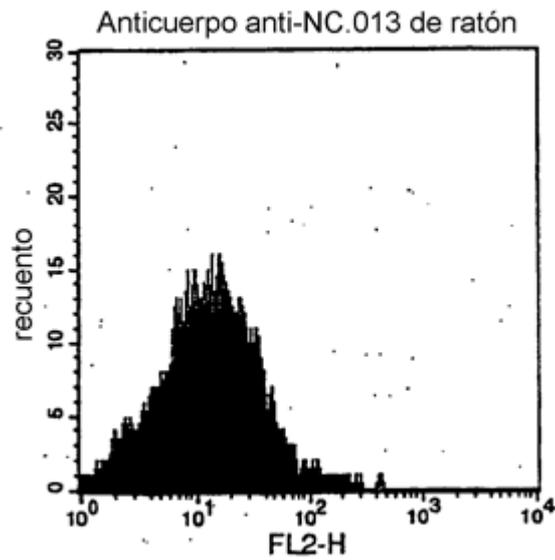


Anticuerpo KM292-1-24

Fig. 5



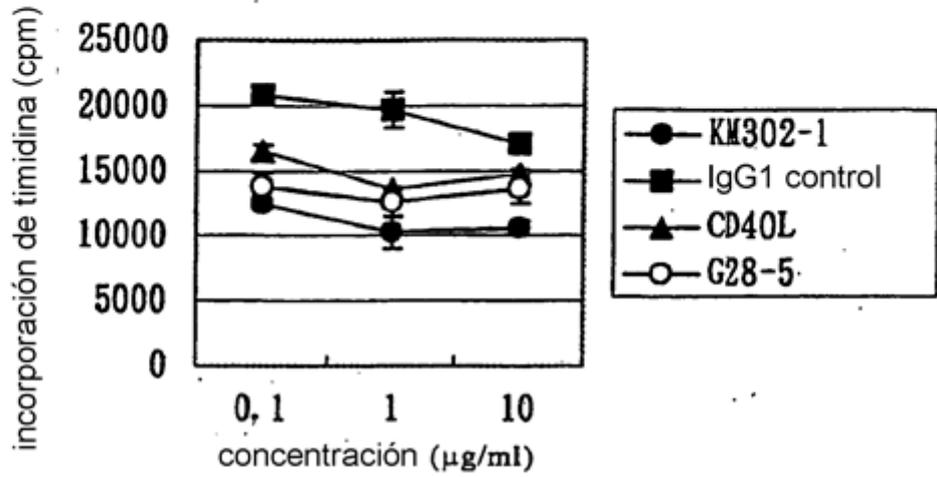
Anticuerpo 5D12 + anticuerpo anti-IgG de ratón



Anticuerpo anti-IgG de ratón sólo

Fig. 6

HS-Sulton



Ramos

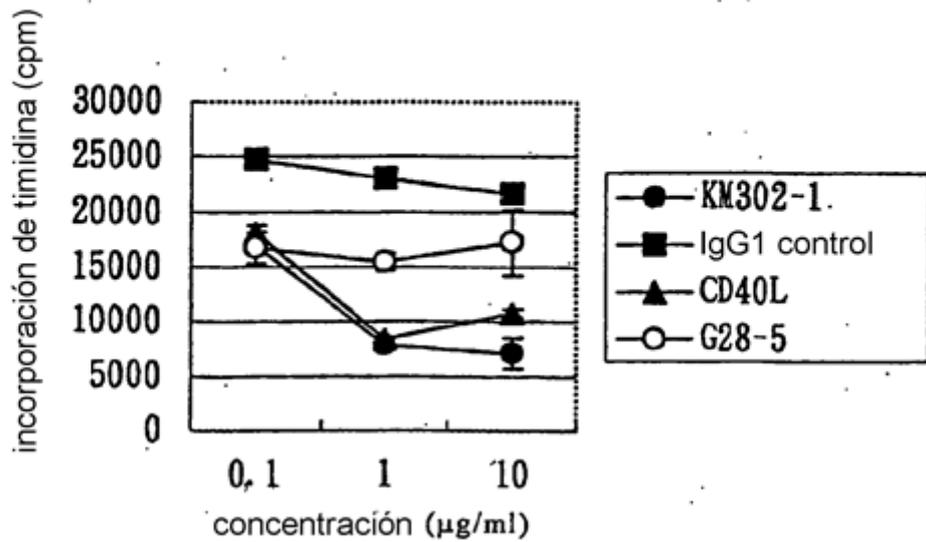
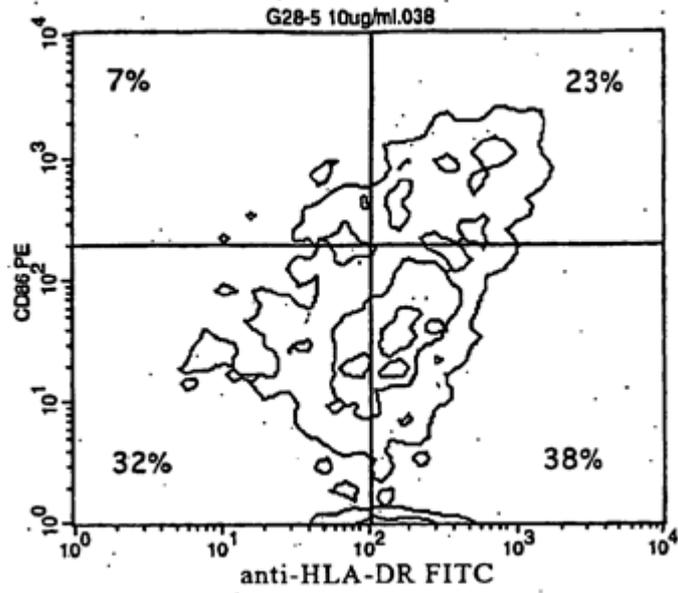
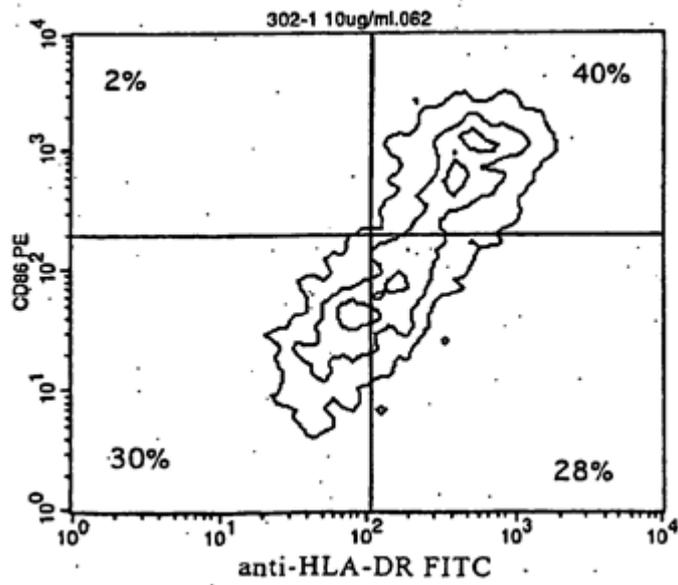


Fig. 7



Anticuerpo G28-5



Anticuerpo KM302-1

Fig. 8

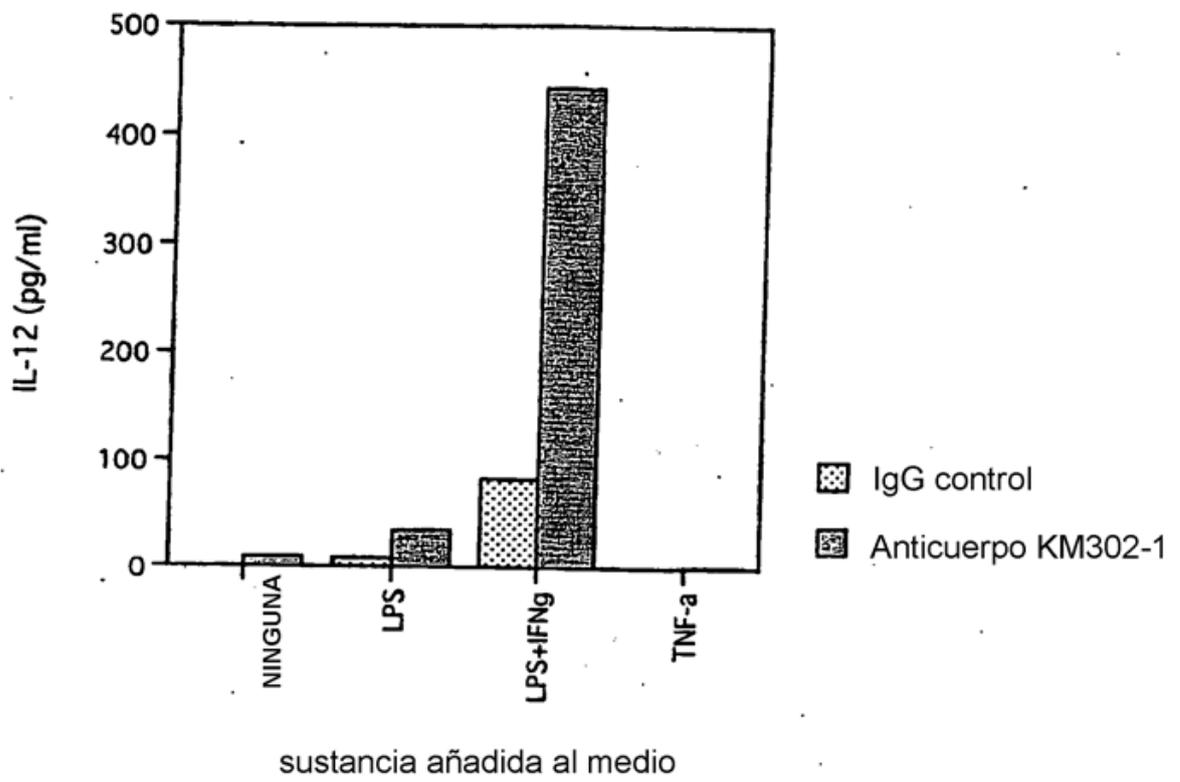


Fig.9

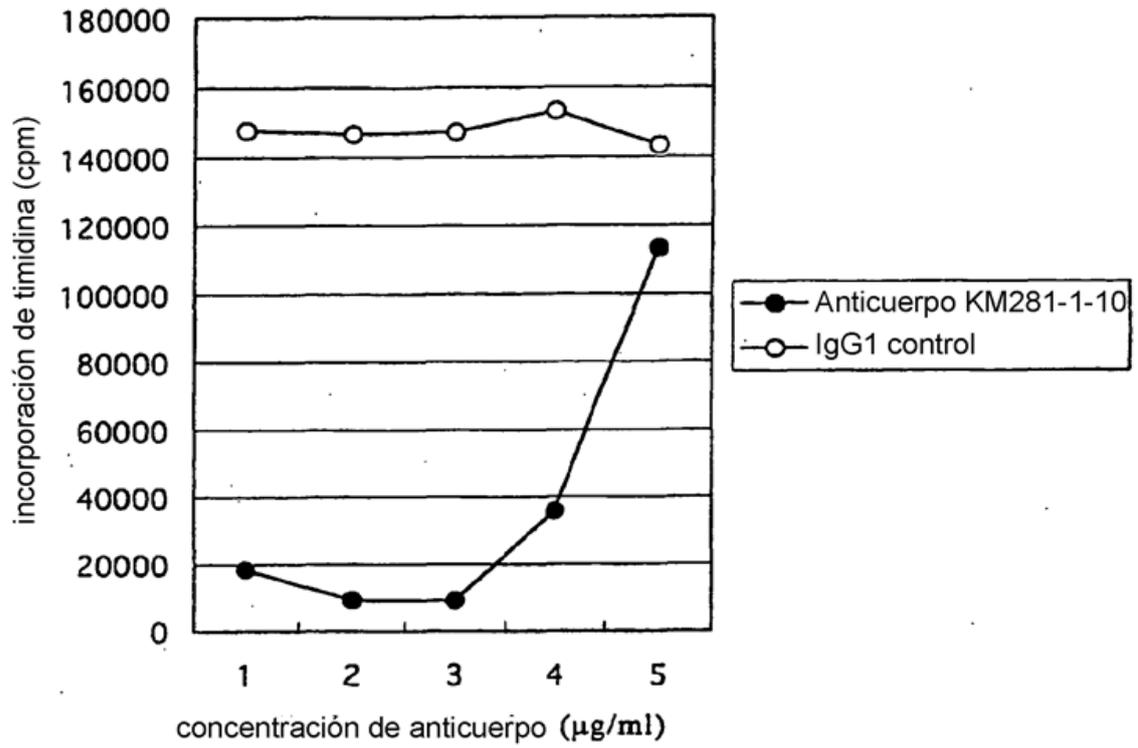


Fig. 10

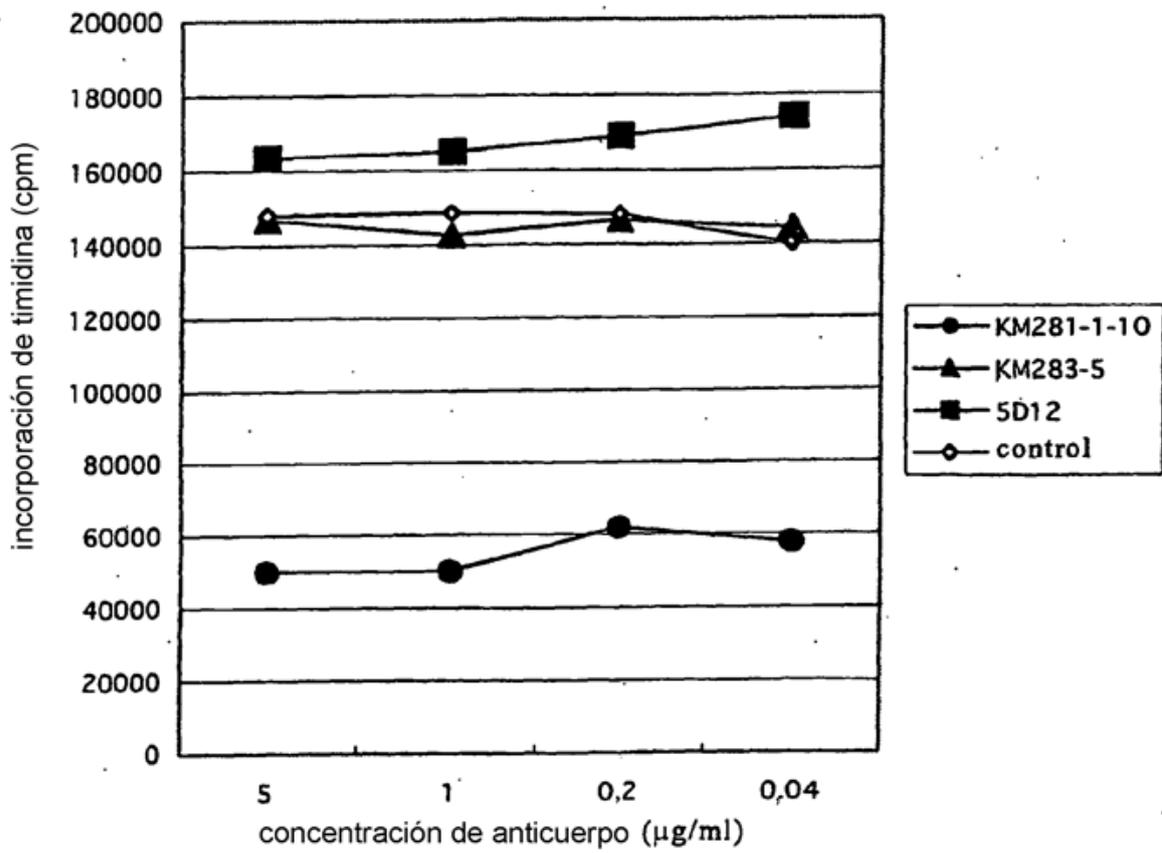


Fig. 11

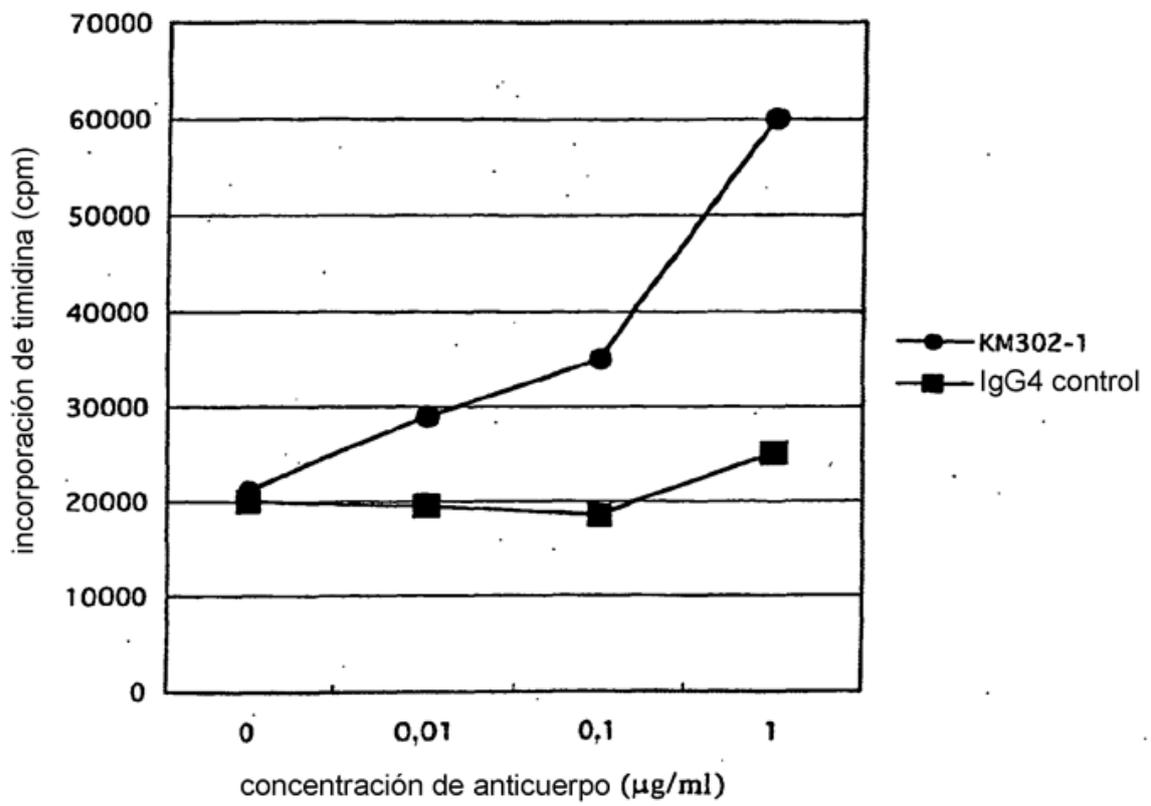


Fig. 12

Acción de anticuerpo anti-CD40 agonista para aumentar la expresión de CD95 en células Ramos

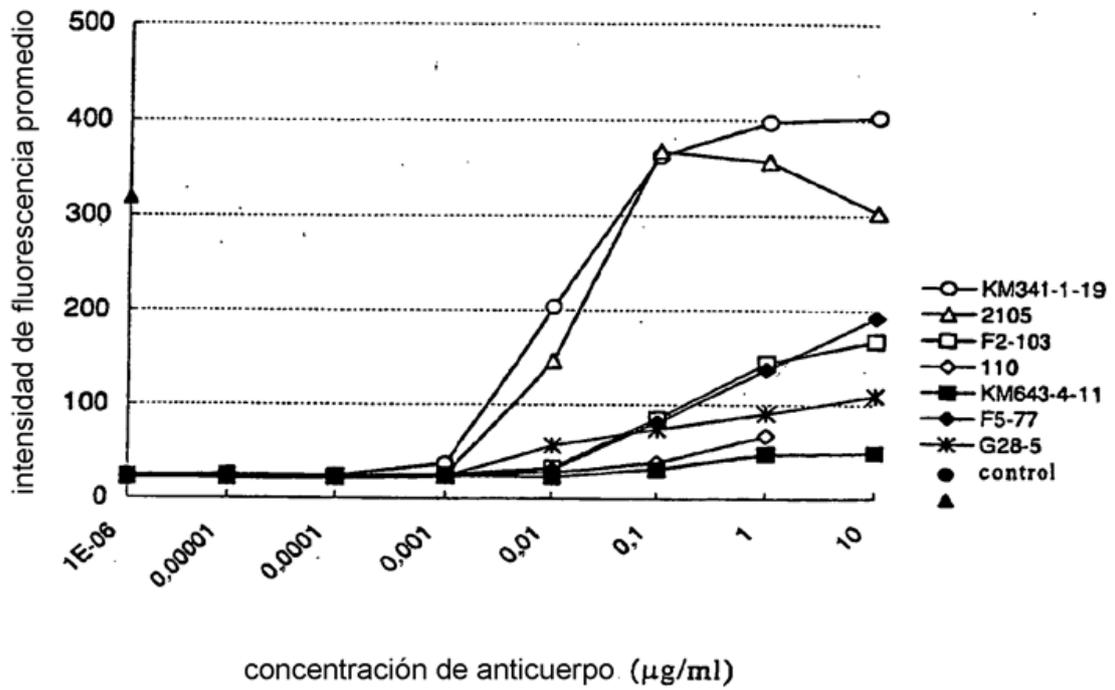


Fig. 13

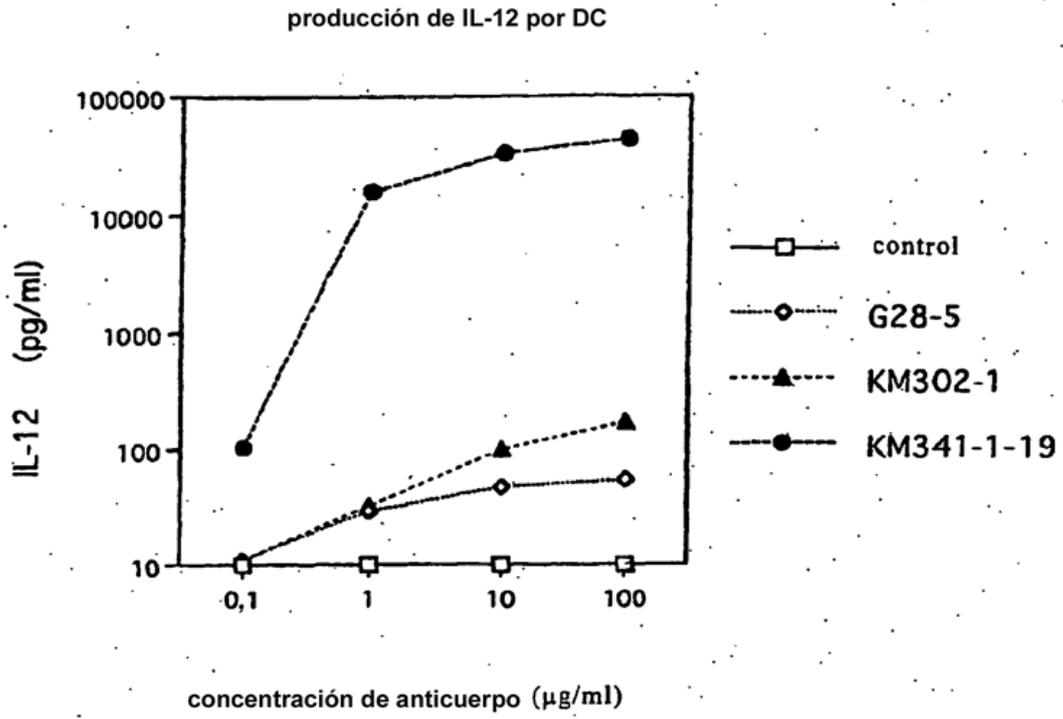


Fig. 14

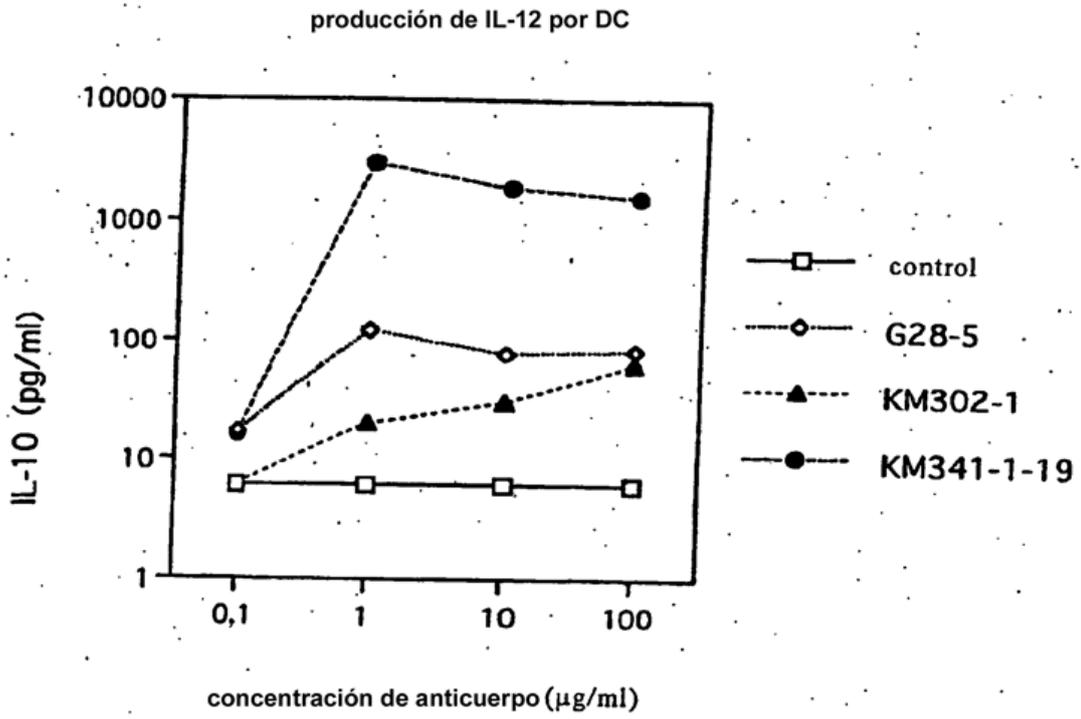


Fig. 15

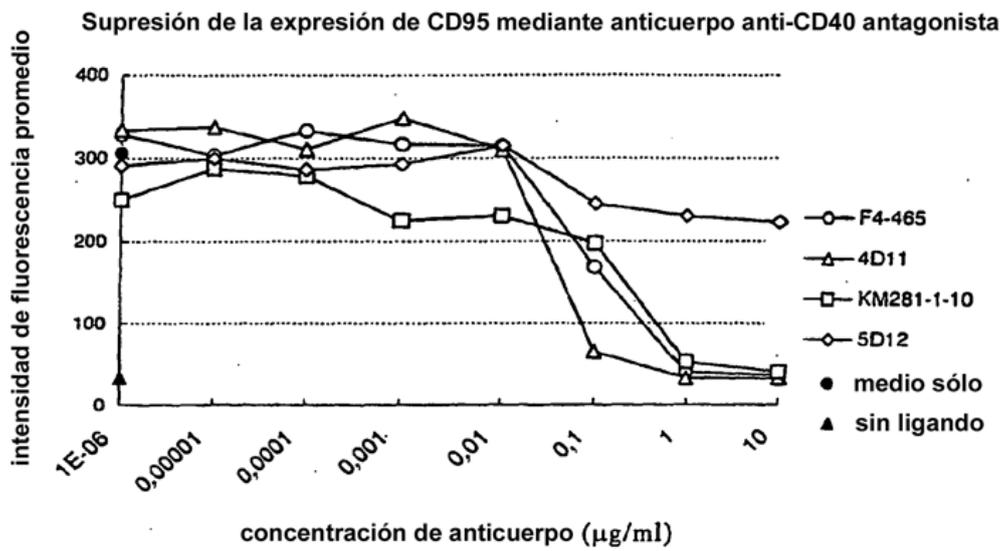


Fig. 16

efecto antitumoral de anticuerpo anti-CD40 en modelo de trasplante de células Ramos

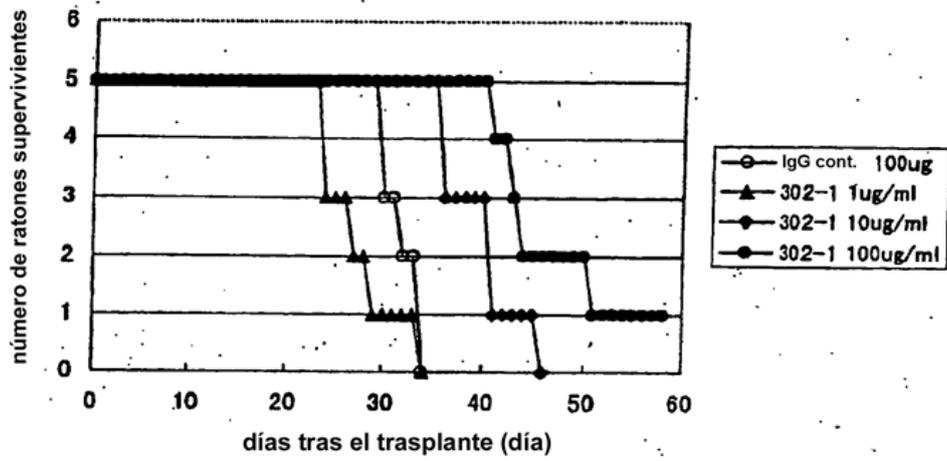


Fig. 17A

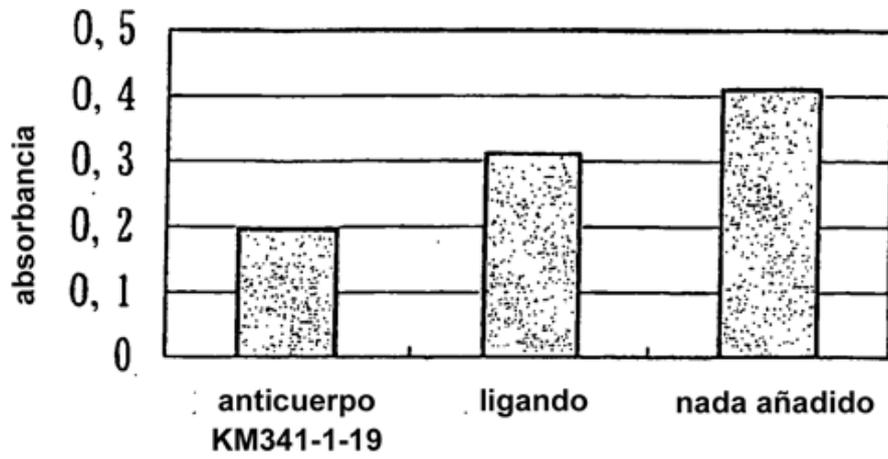


Fig.17B

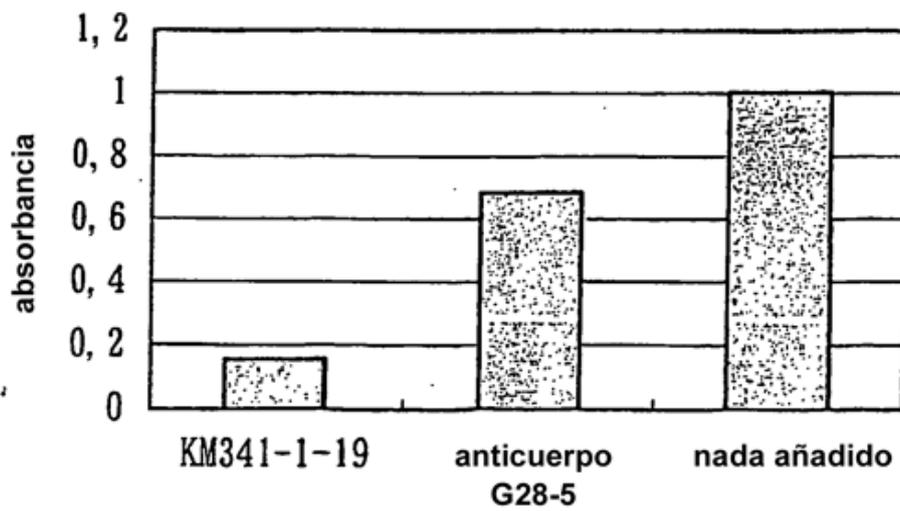


Fig. 18

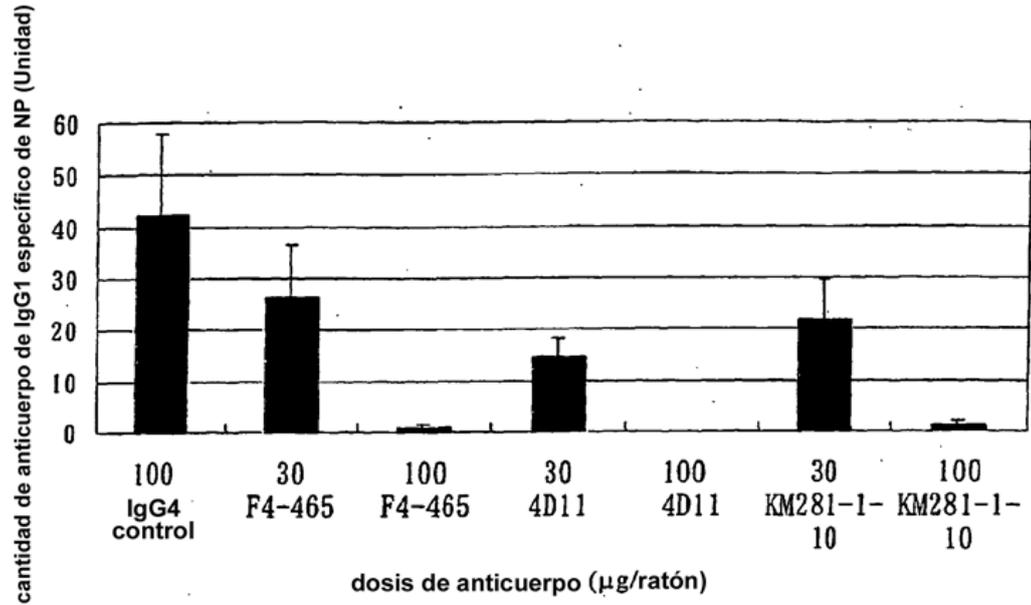


Fig. 19

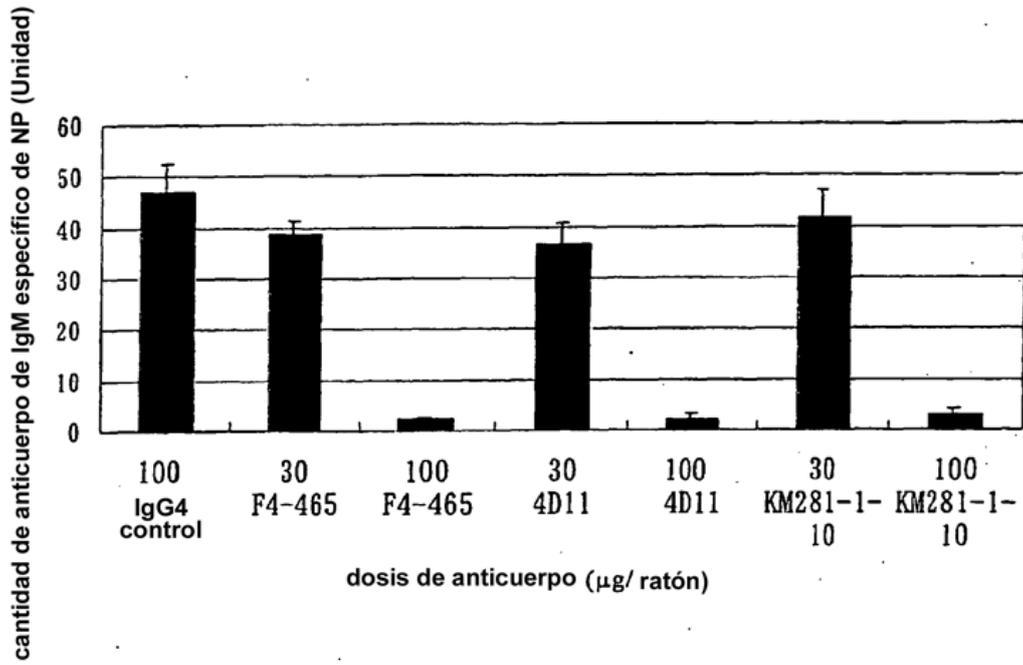


Fig. 20

