

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 081**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C12R 1/91 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2010 E 10767069 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015 EP 2423228**

54 Título: **Anticuerpo que contiene IgG2 que presenta una mutación de aminoácido introducida en el mismo**

30 Prioridad:

20.04.2009 US 170738 P

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

24.02.2016

73 Titular/es:

**KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. (100.0%)
1-6-1, Ohtemachi Chiyoda-ku
Tokyo 100-8185, JP**

72 Inventor/es:

**MATSUSHIMA, AKI;
NAMISAKI, HIROSHI y
YAGI, SHIGENORI**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 561 081 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 que contiene IgG2 que presenta una mutación de aminoácido introducida en el mismo.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que se une a CD40 humano, comprende una región constante de cadena pesada que es IgG2 en la que valina en la posición 234, glicina en la posición 237 y prolina en la posición 331 se sustituyen al menos por alanina, alanina y serina, respectivamente (la numeración se basa en el índice EU de Kabat et al.), y tiene actividad agonista; a un ADN que codifica el anticuerpo monoclonal; a un vector que comprende el ADN; a un transformante obtenible introduciendo el vector; a un procedimiento para producir el anticuerpo monoclonal usando el transformante; y a una composición farmacéutica y a un agente terapéutico que comprenden el anticuerpo monoclonal.

15 **Antecedentes de la invención**1. CD40

El CD40 es un antígeno que tiene un peso molecular de 50 kDa y está presente en la superficie de la membrana celular, y es expresado en células B, células dendríticas (DCs), algunos tipos de células cancerosas, y células epiteliales tímicas. Se sabe que CD40 desempeña un papel importante en la proliferación y diferenciación de células B y DCs. CD40 se identificó como un antígeno expresado en la superficie de células B humanas (documentos 1 y 2 no de patente), y se ha considerado como un miembro de la familia de receptores de TNF a la que pertenecen los receptores de NGF de baja afinidad, receptores de TNF, CD27, OX40, CD30 y similares. Se ha encontrado que un ligando (CD40L) para CD40s humanos y murinos es una proteína de membrana de tipo II expresada en células CD4+T activadas. También se ha encontrado que CD40L introduce señales potentes para la activación en células B humanas o murinas.

Se considera que la expresión de CD40 en DC es mayor que en la célula B, y está claro que CD40 desempeña un papel importante. La unión de CD40 a CD40L activa una célula presentadora de antígeno (APC). Principalmente, activa la expresión de moléculas coestimuladoras tales como CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2), o potencia la producción de IL-2 (documentos 3 y 4 no de patente). DC tiene una fuerte actividad presentadora de antígeno y una fuerte capacidad para activar células T auxiliares (Th). También se considera que DC controla la diferenciación de células Th indiferenciadas en células Th1 o Th2. Cuando monocitos de sangre periférica, que son células dendríticas mieloides, se cultivan en presencia de GM-CSF e IL-4, y maduran mediante CD40L, las células dendríticas maduras resultantes (DC 1) pueden producir IL-12 *in vitro*, y estimulan y activan células Th indiferenciadas alogénicas para inducir células T productoras de IFN γ (es decir, para promover su diferenciación en Th1). Esta función es inhibida por el anticuerpo anti-IL-12, y por tanto puede ser una reacción mediada por IL-12. Por otro lado, cuando células T plasmacitoides, que están presentes en regiones T linfoides y en sangre periférica, se cultivan en presencia de IL-3 y CD40L, se muestra que las células dendríticas linfoides resultantes (CD2) son incapaces de producir IL-12, y estimulan y activan células Th indiferenciadas alogénicas para inducir células T productoras de IL-4, lo que indica promoción de su diferenciación en Th2. Se considera que las células Th1 están implicadas en la activación de la inmunidad celular, mientras que las células Th2 están asociadas con el potenciamiento de la inmunidad humoral así como también la restricción de la inmunidad celular. Cuando células T citotóxicas (CTL) son activadas con la ayuda de células Th1, pueden eliminar patógenos (diversos virus, listerias, bacterias de la tuberculosis, protozoos de toxoplasmas, etc.) que crecen en el citoplasma y células tumorales.

Se ha demostrado que el anticuerpo monoclonal anti-CD40, que reconoce CD40 expresado sobre la superficie de membrana, tiene actividades biológicas diferentes a las células B. El anticuerpo monoclonal anti-CD40 se clasifica generalmente en sustancia agonista (anticuerpo antagonista) o sustancia antagonista (anticuerpo antagonista) frente a CD40.

2. Anticuerpos agonistas

Como función de un anticuerpo agonista, se conoce la activación de células B. Por ejemplo, se ha dado a conocer que el anticuerpo anti-CD40 induce la adhesión celular (documentos 5 y 6 no de patente), incrementa el tamaño celular (documentos 6 y 7 no de patente), induce la división celular de células B activadas solamente mediante un anticuerpo anti-IgM, anticuerpo anti-CD20 o mediante éster de forbol (documentos 8 a 10 no de patente), induce la división celular de células B en presencia de IL-4 (documentos 7 y 11 no de patente), induce la expresión de IgE mediante células cultivadas estimuladas con IL-4 y desprovistas de células T (documentos 12 y 13 no de patente), induce la expresión de IgG e IgM por esas células cultivadas (documentos 13 no de patente), segrega CD23/Fc ϵ RII soluble a partir de células debido a IL-4 (documentos 14 y 15 no de patente), potencia la expresión de CD23/Fc ϵ RII soluble en las células debido a IL-4 (documentos 16 no de patente), y promueve la producción de IL-6 (documento 17 no de patente).

Además, se ha dado a conocer que la adición de IL-4 y un anticuerpo anti-CD40 a células B de cultivo primario

humanas en presencia de células adhesivas CDw32+ conduce al establecimiento de células B clonadas derivadas de aquellas (documento 18 no de patente), y la apoptosis de células de centros germinales fue inhibida por CD40 independientemente de si su receptor antigénico estaba activo o inactivo (documento 19 no de patente). Como se describe anteriormente, puesto que CD40 se ha identificado como antígeno expresado en la superficie de células B humanas, la mayoría de los anticuerpos aislados se han evaluado principalmente mediante su potencia de inducción para la proliferación y/o diferenciación de células B humanas o su actividad de inducción para la muerte celular de células cancerosas, como un índice (documentos 20, 21 y 22 no de patente).

Además, se ha demostrado que el anticuerpo anti-CD40 madura DC (documento 23 no de patente). Además, se ha dado a conocer que el papel de células T CD4 a la hora de cebar células T CD8 específicas del antígeno corresponde a la activación de DC vía la señalización de CD40-CD40L, y se ha encontrado que el anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD40 es capaz de sustituir células T auxiliares CD40 en la activación de DC (documento 24 no de patente). También, se ha encontrado que la administración de un anticuerpo anti-CD40 en ratones es capaz de proteger al cuerpo del animal frente a células tumorales que expresan CD40, así como frente a células tumorales que no expresan CD40 (documento 25 no de patente).

Se espera que un anticuerpo anti-CD40 que tiene una actividad agonista sea eficaz para el tratamiento de enfermedades infecciosas debido a bacterias y virus; neoplasias; y similares, en base a sus funciones descritas anteriormente.

Como un anticuerpo anti-CD40 que tiene una actividad agonista, en el documento 1 de patente se describe el anticuerpo KM341-1-19. El hibridoma KM341-1-19 que produce el anticuerpo KM341-1-19 (número de acceso: FERM BP-7759) se depositó el 27 de septiembre de 2001 para el depósito internacional bajo el Tratado de Budapest, a nombre de International Patent Organisms Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (central 6, 1-1, Higashi 1, Tsukuba, Ibaraki, Japón). La región constante de cadena pesada del anticuerpo KM341-1-19, y el anticuerpo 341G2Ser, que tiene una región constante de cadena pesada que es IgG2 en la que la prolina en la posición 331 está sustituida por serina (esta sustitución está representada por P331S; en lo sucesivo, representada como la misma; la numeración se basa en el índice EU del documento 26 no de patente), se describen en el documento 2 de patente.

El anticuerpo anti-CD40 21.4.1 que tiene actividad agonista se describe en el documento 3 de patente.

3. Mutación de aminoácido

Se ha dado a conocer que una región en las posiciones 233-299 de una región bisagra inferior de IgG (la numeración se basa en el índice EU de Kabat et al.) es una de las regiones de unión a un receptor Fc γ , que es un miembro del receptor Fc inmunoglobulínico (documento 27 no de patente). El receptor Fc inmunoglobulínico desempeña un papel importante en la respuesta inmune mediada por anticuerpos. Específicamente, induce fagocitosis, actividad de ADCC (documentos 28 y 29 no de patente), y similar. El receptor Fc γ se expresa en la superficie de leucocitos, y se divide en tres clases de Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), y Fc γ RIII (CD16). Además, Fc γ RII se subdivide en Fc γ RIIA y Fc γ RIIB, y Fc γ RIII se subdivide en Fc γ RIIIA y Fc γ RIIIB.

Se ha dado a conocer que la unión de un receptor Fc γ se reduce sustituyendo una región bisagra inferior de IgG1 por IgG2, que es una subclase que tiene una actividad de función efectora débil de un anticuerpo a través de un receptor Fc γ . Específicamente, ejemplos de E233P, L234V, L235A, supresión de G236 y similar (la numeración se basa en el índice EU de Kabat et al. (documentos 30 a 33 no de patente). Como se explica anteriormente, se sabe que una actividad de función efectora de un anticuerpo a través de un receptor Fc γ es débil para un anticuerpo que tiene IgG2 como subclase, y se ha dado a conocer que la lisis de una célula diana por una célula efectora puede ser inhibida adicionalmente mediante la sustitución de V234A y G237A (la numeración se basa en el índice EU de Kabat et al.) (documento 34 no de patente). Sin embargo, no se describen los efectos de V234A y G237A sobre la actividad agonista de un anticuerpo anti-CD40. Como alternativa, no se describen los efectos de V234A y G237A en la subclase IgG2 sobre la cinética de la sangre de un anticuerpo anti-CD40. Aún más, no se describen los efectos de V234A y G237A en la subclase IgG2 de un anticuerpo anti-CD40 en el hígado.

Por ejemplo, L235, D265, D270, K322, P331 y P329 (la numeración se basa en el índice EU de Kabat et al.) desempeñan un papel importante en la capacidad activadora del complemento de IgG humana, y la actividad de CDC se puede reducir sustituyendo estos sitios por otros aminoácidos (documentos 35 a 40 no de patente). Específicamente, la reducción en la actividad de CDC se puede lograr sustituyendo D270, K322, P329 y/o P331 por A. Como alternativa, la reducción en la actividad de CDC se puede lograr sustituyendo P331 por S o G.

Listado de citas

Documento de patente

Documento 1 de patente: WO02/088186

Documento 2 de patente: WO2005/06398

Documento 3 de patente: WO03/040170

5

Documento no de patente

Documento 1 no de patente: E. A. Clark et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4494, 1986

10

Documento 2 no de patente: I. Stamenkovic et al., EMBO J. 8: 1403, 1989

Documento 3 no de patente: Caux, C., et al., J. Exp. Med., 180: 1263, 1994

15

Documento 4 no de patente: Shu, U., et al., Eur. J. Immunol., 25: 1125, 1995

Documento 5 no de patente: Barrett et al., J. Immunol. 146: 1722, 1991

Documento 6 no de patente: Gordon et al., J. Immunol. 140: 1425, 1998

20

Documento 7 no de patente: Valle et al., Eur. J. Immunol. 19: 1463, 1989

Documento 8 no de patente: Clark y Ledbetter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4494, 1986

25

Documento 9 no de patente: Gordon et al., LEUCOCYTE TYPING III. A. J. McMichael ed. Oxford University Press. Oxford. p. 426

Documento 10 no de patente: Paulie et al., J. Immunol. 142: 590, 1989

30

Documento 11 no de patente: Gordon et al., Eur. J. Immunol. 17: 1535, 1987

Documento 12 no de patente: Jabara et al., J. Exp. Med. 172: 1861, 1990

Documento 13 no de patente: Gascan et al., J. Immunol. 147: 8, 1991

35

Documento 14 no de patente: Gordon y Guy, Immunol. Today 8: 39, 1987

Documento 15 no de patente: Cairns et al., Eur. J. Immunol. 18: 349, 1988

40

Documento 16 no de patente: Challa, A., Allergy, 54: 576, 1999

Documento 17 no de patente: Clark y Shu, J. Immunol. 145: 1400, 1990

Documento 18 no de patente: Bancherauet et al., Science 241: 70, 1991

45

Documento 19 no de patente: Liu et al., Nature 342: 929, 1989

Documento 20 no de patente: Katira, A. et al., LEUKOCYTE TYPING V. S. F. Schlossosman, et. al. eds. p. 547. Oxford University Press. Oxford

50

Documento 21 no de patente: W. C. Flansow et al., LEUKOCYTE TYPING V. S. F. Schlossosman, et al. eds. p. 555. Oxford University Press. Oxford

Documento 22 no de patente: J. D. Pound et al., International Immunology, 11: 11, 1999

55

Documento 23 no de patente: Z. H. Zhou et al., Hybridoma, 18: 471, 1999

Documento 24 no de patente: Shoenberger, S. P., et al., Nature, 480, 1998

60

Documento 25 no de patente: French, R. R., et al., Nature Medicine, 5, 1999

Documento 26 no de patente: Kabat et. al., Sequences of proteins of Immunological Interest, 1991 Quinta edición

Documento 27 no de patente: Duncan, A.R. et al., Nature 332: 563

65

Documento 28 no de patente: Gessner, J.E. et al., Ann. Hematol. 1998; 76: 231

Documento 29 no de patente: Da'ron, M. et al., Annu. Rev. Immunol. 1997, 15: 203

Documento 30 no de patente: Wines, B.D. et al., J. Immunol. 2000, 164: 5313

5 Documento 31 no de patente: Lund, J. et al., Mol. Immunol. 1992, 29: 53

Documento 32 no de patente: Sarmay, G et al., Mol. Immunol. 1992, 29: 633

10 Documento 33 no de patente: Jefferis, R. et al., Mol. Immunol. 1990, 27: 1237

Documento 34 no de patente: Michael, S., et al., J. Immunol., 1997, 159: 3613

Documento 35 no de patente: Esohe E. Idusogie et al. J. Immunol. 2000, 164: 4178-4184

15 Documento 36 no de patente: Yuanyuan Xu et al. J. Biol. Chem. 1994, 269: 3469-3474

Documento 37 no de patente: Brekhe, O.H. et al. Eur. J. Immunol. 1994, 24: 2542

20 Documento 38 no de patente: Morgan, A., et al., Immunology 1995, 86: 319

Documento 39 no de patente: Lund, J., et al., J. Immunol., 1996, 157: 4963

Documento 40 no de patente: Tao, M.H., et. al., J. Exp. Med. 1993, 178: 661

25 **Descripción de la invención**

Problema que resuelve la invención

30 Un objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo monoclonal que tiene una actividad agonista y se une a CD40 humano; un ADN que codifica el anticuerpo monoclonal; un vector que contiene el ADN; un transformante obtenible introduciendo el vector; un procedimiento para producir el anticuerpo monoclonal usando el transformante; y una composición farmacéutica y un agente terapéutico que comprenden el anticuerpo monoclonal.

Medio para resolver el problema

35 Se ha construido un anticuerpo monoclonal (en adelante denominado en la presente memoria "anticuerpo IgG2-AAS") que tiene una región constante de cadena pesada que es IgG2 (en adelante denominada en la presente memoria "IgG2-AAS") en la que valina en la posición 234, glicina en la posición 237 y prolina en la posición 331 están al menos sustituidos por alanina (V234A), alanina (G237A) y serina (P331S), respectivamente (la numeración se basa en el índice EU de Kabat et al), y se une a CD40 humano, y de este modo se ha completado la presente invención.

Principalmente, la presente invención se refiere a lo siguiente:

45 [1]. Un anticuerpo monoclonal que comprende la región constante de cadena pesada representada por SEC ID NO:30, tiene actividad agonista, y se une a CD40 humano, en el que el anticuerpo monoclonal comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por SEC ID NOs: 6, 8 y 10, respectivamente, y la región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por SEC ID NOs:16, 18 y 20, respectivamente.

50 [2]. El anticuerpo monoclonal según [1],

(a) que comprende la región variable de cadena pesada representada por SEC ID NO:4, y la región variable de cadena ligera representada por SEC ID NO:14; o

55 (b) que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo producido mediante un hibridoma KM341-1-19 (FERM BP-7759), y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo producido por un hibridoma KM341-1-19 (FERM BP-7759).

60 [3]. Un ADN que codifica el anticuerpo monoclonal según cualquiera de [1] a [2].

[4]. Un vector recombinante que comprende el ADN según [3].

65 [5]. Un transformante obtenible introduciendo el vector recombinante según [4] en una célula hospedadora.

[6]. Un procedimiento para producir el anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de [1] a [2], que comprende

cultivar el transformante descrito en [5] en un medio para formar y acumular el anticuerpo monoclonal descrito en uno cualquiera de [1] a [2] en el cultivo, y recuperar el anticuerpo monoclonal a partir del cultivo.

- 5 [7]. El anticuerpo monoclonal según [1], que comprende un polipéptido en el que se elimina una señal de secreción del polipéptido representado por SEC ID NO:2, y un polipéptido en el que se elimina una señal de secreción del polipéptido representado por SEC ID: 12.
- 10 [8]. Un vector recombinante que comprende un ADN que codifica un polipéptido en el que se elimina una señal de secreción del polipéptido representado por SEC ID NO:2, y un ADN que codifica un polipéptido en el que se elimina una señal de secreción del polipéptido representado por SEC ID NO:12.
- [9]. Un transformante obtenible introduciendo el vector recombinante según [8] en una célula hospedadora.
- 15 [10]. Un procedimiento para producir el anticuerpo monoclonal según [7], que comprende cultivar en un medio el transformante descrito en [9] para formar y acumular el
- [11]. El procedimiento de uno cualquiera de [6] o [10], en el que el procedimiento comprende además purificar el anticuerpo monoclonal.
- 20 [12]. El procedimiento de uno cualquiera de [6], [10] u [11], en el que el procedimiento comprende además proporcionar el anticuerpo monoclonal en una preparación farmacéutica.
- [13]. Un anticuerpo monoclonal, que es obtenible mediante el procedimiento de uno cualquiera de [6] y [10]-[12].
- 25 [14]. Uso del anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de [1] a [2] y [7], para la fabricación de un agente terapéutico para tumores malignos o infecciones.
- [15]. El anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de [1] a [2] y [7], para uso en el tratamiento de tumores malignos o infecciones.
- 30

La presente descripción también proporciona:

- 35 (1) Un anticuerpo monoclonal que comprende una región constante de cadena pesada que es IgG2, en la que valina en la posición 234, glicina en la posición 237 y prolina en la posición 331 están al menos sustituidos por alanina, alanina y serina, respectivamente (la numeración se basa en el índice EU de Kabat et al); tiene actividad agonista; y se une a CD40 humano;
- 40 (2) Un anticuerpo monoclonal que comprende la región constante de cadena pesada representada por SEC ID NO:30, tiene actividad agonista, y se une a CD40 humano;
- 45 (3) El anticuerpo monoclonal según el (1) o (2) anterior, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por SEC ID NOs: 6, 8 y 10, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por SEC ID NOs:16, 18 y 20, respectivamente;
- 50 (4) El anticuerpo monoclonal según (1) o (2) anterior, que comprende la región variable de cadena pesada representada por SEC ID NO:4, y la región variable de cadena ligera representada por SEC ID NO:14;
- (5) El anticuerpo monoclonal según el (1) o (2) anterior, que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo producido por un hibridoma KM341-1-19 (FERM BP-7759), y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo producido por un hibridoma KM341-1-19 (FERM BP-7759);
- 55 (6) El anticuerpo monoclonal según el (1) o (2) anterior, que compete con un anticuerpo producido por un hibridoma KM341-1-19 (FERM BP-7759);
- (7) El anticuerpo monoclonal según el (1) o (2) anterior, que se une a una parte o a la totalidad de un epítipo en CD40 humano al que se une un anticuerpo producido por un hibridoma KM341-1-19 (FERM BP-7759);
- 60 (8) Un ADN que codifica el anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los (1) a (7) anteriores;
- (9) Un vector recombinante que comprende el ADN según el (8) anterior;
- (10) Un transformante obtenible introduciendo el vector recombinante según el (9) anterior en una célula hospedadora;
- 65 (11) Un procedimiento para producir el anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los (1) a (7) anteriores,

que comprende cultivar en un medio el transformante descrito en el (10) anterior para formar y acumular en el cultivo el anticuerpo monoclonal descrito en uno cualquiera de los (1) a (7) anteriores, y recuperar el anticuerpo monoclonal a partir del cultivo;

- 5 (12) El anticuerpo monoclonal según el (1) o (2) anterior, que comprende una región constante de cadena pesada en la que se elimina una señal del polipéptido representado por SEC ID NO:2, y una región constante de cadena ligera en la que se elimina una señal del polipéptido representado por SEC ID NO:12;
- 10 (13) Un vector recombinante que comprende un ADN que codifica un polipéptido en el que se elimina una señal del polipéptido representado por SEC ID NO:2;
- (14) Un vector recombinante que comprende un ADN que codifica un polipéptido en el que se elimina una señal del polipéptido representado por SEC ID NO:12;
- 15 (15) Un vector recombinante que comprende un ADN que codifica un polipéptido en el que se elimina una señal del polipéptido representado por SEC ID NO:1, y un ADN que codifica un polipéptido en el que se elimina una señal de un polipéptido representado por SEC ID NO:11;
- 20 (16) Un transformante obtenible introduciendo en una célula hospedante los vectores recombinantes según los (13) y (14) anteriores;
- (17) Un transformante obtenible introduciendo en una célula hospedante el vector recombinante según el (15) anterior;
- 25 (18) Un procedimiento para producir el anticuerpo monoclonal descrito en el (12) anterior, que comprende cultivar en un medio el transformante descrito en el (16) o (17) anterior para formar y acumular en el cultivo el anticuerpo monoclonal descrito en el (12) anterior, y obtener de ese modo el anticuerpo monoclonal a partir del cultivo;
- 30 (19) Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los (1) a (7) y (12) anteriores, como principio activo;
- (20) Un agente terapéutico para tumores malignos o infecciones, que comprende el anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los (1) a (7) y (12) anteriores, como principio activo;
- 35 (21) Uso del anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los (1) a (7) y (12) anteriores, para la fabricación de un agente terapéutico para tumores malignos o infecciones;
- (22) el anticuerpo monoclonal según uno cualquiera de los (1) a (17) y (12) anteriores, para tratar tumores malignos o infecciones; y
- 40 (23) Un método para tratar tumores malignos o infecciones, que comprende administrar el anticuerpo según uno cualquiera de los (1) a (7) y (12) anteriores.

45 **Ventaja de la invención**

Como se muestra en los siguientes Ejemplos, un anticuerpo monoclonal (anticuerpo IgG2-AAS), que comprende una región constante de cadena pesada, IgG2-AAS, y se une a CD40 humano, muestra una actividad agonista notablemente elevada. Por lo tanto, la presente invención puede proporcionar el anticuerpo monoclonal que comprende una región constante de cadena pesada que es IgG2, en la que valina en la posición 234, glicina en la posición 237 y prolina en la posición 331 están sustituidos al menos por alanina, alanina y serina, respectivamente (la numeración se basa en el índice EU de Kabat et al.); tiene actividad agonista; y se une a CD40 humano (denominado en la presente memoria en adelante como "anticuerpo monoclonal de la presente invención"); un ADN que codifica el anticuerpo monoclonal; un vector que comprende el ADN; un transformante obtenible introduciendo el vector; un procedimiento para producir el anticuerpo monoclonal usando el transformante; y una composición farmacéutica y un agente terapéutico que comprenden el anticuerpo monoclonal. Como alternativa, como se muestra en el siguiente Ejemplo, el anticuerpo IgG2-AAS(341), uno de los anticuerpos monoclonales, tiene un mayor tiempo de permanencia en plasma en comparación con IgG2-S(341). Aún más, el anticuerpo IgG2-AAS(341) tiene una menor toxicidad hepática en comparación con IgG2-S(341).

60 **Breve descripción de dibujos**

[Figura 1A] La figura 1A muestra la actividad de unión del anticuerpo IgG2-AAS(341). La abscisa representa la concentración de anticuerpo (µg/ml), y la ordenada representa la intensidad de fluorescencia media. La intensidad de fluorescencia media del anticuerpo IgG2-AAS(341) está representada por la marca • y la línea discontinua; la intensidad de fluorescencia media del anticuerpo IgG2-S(341)

está representada por la marca \circ y la línea continua; y la intensidad de fluorescencia media del anticuerpo de control negativo está representada por la marca * y la línea punteada.

5 [Figura 1B] La figura 1B muestra la actividad de unión del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1). La abscisa representa la concentración de anticuerpo ($\mu\text{g/ml}$), y la ordenada representa la intensidad de fluorescencia media. La intensidad de fluorescencia media del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1) está representada por la marca \bullet y la línea discontinua; la intensidad de fluorescencia media del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1) está representada por la marca \circ y la línea continua; y la intensidad de fluorescencia media del anticuerpo de control negativo está representada por la marca * y la línea punteada.

10 [Figura 2A] La figura 1A muestra una actividad agonista del anticuerpo IgG2-AAS(341). La abscisa representa la concentración de anticuerpo ($\mu\text{g/ml}$), y la ordenada representa la intensidad de fluorescencia media. La intensidad de fluorescencia media del anticuerpo IgG2-AAS(341) está representada por la marca \bullet y la línea discontinua; la intensidad de fluorescencia media del anticuerpo IgG2-S(341) está representada por la marca \circ y la línea continua; y la intensidad de fluorescencia media del anticuerpo de control negativo está representada por la marca * y la línea punteada.

15 [Figura 2B] La figura 2B muestra una actividad agonista del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1). La abscisa representa la concentración de anticuerpo ($\mu\text{g/ml}$), y la ordenada representa la intensidad de fluorescencia media. La intensidad de fluorescencia media del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1) está representada por la marca \bullet y la línea discontinua; la intensidad de fluorescencia media del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1) está representada por la marca \circ y la línea continua; y la intensidad de fluorescencia media del anticuerpo de control negativo está representada por la marca * y la línea punteada.

20 [Figura 3] La figura 3 muestra la concentración del anticuerpo IgG2-AAS(341) en sangre. La abscisa representa el tiempo tras la administración (días), y la ordenada representa la concentración de fármaco en sangre. La concentración de fármaco en sangre del anticuerpo IgG2-AAS(341) está representada por la marca \bullet y la línea discontinua; la concentración de fármaco en sangre del anticuerpo IgG2-S(341) está representada por la marca \circ y la línea continua; y la concentración de fármaco en sangre del anticuerpo de control negativo está representada por la marca * y la línea punteada.

25 [Figura 4A] La figura 4A muestra la concentración de AST en sangre: la abscisa representa el tiempo tras la administración (horas), y la ordenada representa el valor de la actividad (unidad Karmen). La AST en el momento de administrar el anticuerpo IgG2-AAS(341) está representada por la marca \bullet y la línea discontinua; la AST en el momento de administrar el anticuerpo IgG2-S(341) está representada por la marca \circ y la línea continua; y la AST en el momento de administrar PBS está representada por la marca * y la línea punteada.

30 [Figura 4B] La figura 4B muestra la concentración de ALT en sangre. La abscisa representa el tiempo tras la administración (horas), y la ordenada representa el valor de la actividad (unidad Karmen). La ALT en el momento de administrar el anticuerpo IgG2-AAS(341) está representada por la marca \bullet y la línea discontinua; la ALT en el momento de administrar el anticuerpo IgG2-S(341) está representada por la marca \circ y la línea continua; y la ALT en el momento de administrar PBS está representada por la marca * y la línea punteada.

Descripciones de las formas de realización

35 La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que se une a CD40, comprende una región constante de cadena pesada, IgG2-AAS, y tiene actividad agonista.

El anticuerpo de la presente invención se une a una región extracelular de CD40.

40 La unión del anticuerpo de la presente invención a CD40 se puede confirmar mediante radioinmunoensayo usando un método de sándwich en fase sólida o similar, o mediante un método de detección inmunológica conocido usando inmunoensayo enzimático (ELISA) o similar para células que expresan CD40, preferiblemente un método capaz de investigar una actividad de unión de un anticuerpo para una célula que expresa un antígeno particular y el antígeno particular, tal como un método de tinción celular fluorescente. Los ejemplos incluyen un método de tinción de anticuerpo fluorescente [Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)] que usa un sistema FMAT8100HTS (fabricado por Applied Biosystems), un método de tinción celular fluorescente que usa citometría de flujo, resonancia de plasmones de superficie, que usa un sistema Biacore (fabricado por GE Healthcare), u otros métodos. Adicionalmente, además del método anterior, se puede combinar un método de detección inmunológica conocido [Monoclonal Antibodies - Principles and practice, Tercera edición, Academic Press (1996), Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Monoclonal Antibody Experimental Manual, Kodan-sha Scientific

(1987)] para confirmar éstos.

La célula que expresa CD40 puede ser cualquier célula, en tanto que exprese CD40; y los ejemplos incluyen una célula que está presente de forma natural en el cuerpo humano, una estirpe celular creada a partir de la célula que está presente de forma natural en el cuerpo humano, una célula obtenida mediante técnica de recombinación génica, y similar.

La célula que está presente de forma natural en el cuerpo humano incluye una célula que expresa el polipéptido en el cuerpo de un paciente con enfermedad autoinmune, un paciente con alergia, un paciente con cáncer, tal como una célula que expresa CD40 entre células tumorales obtenidas mediante biopsia o similar.

Los ejemplos de la célula que está presente de forma natural en el cuerpo humano incluyen una célula que expresa CD40 entre estirpes celulares obtenidas mediante creación de las células que expresan CD40 obtenidas a partir de los pacientes con cáncer anteriores, y los ejemplos específicos incluyen estirpes celulares creadas a partir de ser humano, tales como Ramas (ATCC CRL-1596), Raji (ATCC CCL-86), Daudi (ATCC CCL-213), T24 (ATCC HTB-4) y similares.

Los ejemplos específicos de la célula obtenida mediante técnicas de recombinación génica incluyen una célula que expresa CD40 obtenida introduciendo, en una célula de insecto, una célula de animal o similar, un vector de expresión que comprende un ADNc que codifica CD40, y similar. La secuencia nucleotídica y la secuencia de aminoácidos de CD40 humano se pueden obtener a partir de una base de datos conocida tal como NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), y están registradas como la secuencia nucleotídica representada por SEC ID NO:35 (número de acceso NCBI: NM_001250) y la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO:37 (número de acceso NCBI: NP_001240), respectivamente. En la presente invención, CD40 significa CD40 humano en ausencia de una explicación particular.

En la presente invención, los ejemplos específicos del anticuerpo monoclonal pueden incluir un anticuerpo segregado por una célula productora de anticuerpo de un solo clon.

El anticuerpo monoclonal significa un anticuerpo que reconoce solamente un epítipo (también denominado determinante antigénico) y tiene secuencia de aminoácidos uniforme (estructura primaria).

En la presente invención, el anticuerpo monoclonal comprende dos cadenas pesada (una región constante de cadena pesada y una región variable de cadena pesada) y dos cadenas ligeras (una región constante de cadena ligera y una región variable de cadena ligera).

El epítipo incluye una única secuencia de aminoácidos, una estructura tridimensional que consiste en una secuencia de aminoácidos, una secuencia de aminoácidos que tiene una cadena de azúcar unida a ella, una estructura tridimensional que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una cadena de azúcar unida a ella, y similar, que un anticuerpo monoclonal reconoce y al cual se une. El epítipo del anticuerpo monoclonal de la presente invención existe preferiblemente en la región extracelular de CD40.

En la presente invención, el anticuerpo recombinante incluye un anticuerpo producido mediante recombinación génica, tal como un anticuerpo quimérico humano, un anticuerpo humano, un anticuerpo humano y un fragmento de anticuerpo del mismo. La CDR es un nombre abreviado de la región determinante de la complementariedad de tipo humano, que se puede denominar en adelante en la presente memoria como la CDR. Entre los anticuerpos recombinantes, es preferible como agente terapéutico aquel que tiene un carácter de actividad monoclonal, baja inmunogenicidad y semivida prolongada en sangre.

El anticuerpo quimérico humano es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada (en adelante denominada en la presente memoria como "VH") y una región variable de cadena ligera (en adelante denominada en la presente memoria como "VL") de un anticuerpo de un animal no humano, y una región constante de cadena pesada (en adelante denominada en la presente memoria como "CH") y una región constante de cadena ligera (en adelante denominada en la presente memoria como "CL") de un anticuerpo humano.

El anticuerpo quimérico humano de la presente invención se puede producir según lo siguiente. Específicamente, el anticuerpo quimérico humano se puede producir obteniendo los ADNc que codifican VH y VL a partir de un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente a CD40 y se une a la región extracelular, insertando cada uno de ellos en un vector de expresión para la célula de animal que comprende los ADN que codifican CH y CL del anticuerpo humano para construir de ese modo un vector para la expresión del anticuerpo quimérico humano, e introduciendo después el vector en una célula de animal para expresar el anticuerpo. Un anticuerpo con CDR injertadas humano es un anticuerpo en el que secuencias de aminoácidos de las CDR de VH y VL del anticuerpo derivado de un animal no humano se injertan en posiciones apropiadas de VH y VL de un anticuerpo humano.

El anticuerpo con CDR injertadas humano de la presente invención se puede producir construyendo los ADNc que

codifican una región variable del anticuerpo (en adelante denominada en la presente memoria como "región V") en la que las secuencias de aminoácidos de las CDR de VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano producido mediante un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente CD40 y se une a la región extracelular se injertan en regiones estructurales de armazón (en adelante denominadas en la presente memoria como "FR") de VH y VL de cualquier anticuerpo humano, insertando cada uno de ellos en un vector para la expresión de célula de animal que comprende genes que codifican CH y CL de un anticuerpo humano para construir de ese modo un vector para la expresión de anticuerpo con CDR injertadas humano, e introducirlo en una célula de animal para expresar y producir de ese modo el anticuerpo con CDR injertadas humano.

Una clase de región constante de cadena pesada de un anticuerpo humano incluye IgA, IgM, IgE e IgG, y una subclase de IgG incluye IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. IgG2 tiene una pluralidad de alotipos (por ejemplo, SEC ID Nos: 33, 34 y 35, en adelante en la presente memoria como alotipos 1, 2 y 3, respectivamente; véanse AAN76042.1, CAC 12842 y AAN76043.1 en Secuencias de Referencias de NCBI), y el anticuerpo monoclonal de la presente invención puede ser uno cualquiera de los alotipos. Una clase de una región constante de cadena ligera de un anticuerpo humano incluye κ y λ , y la región constante de cadena ligera del anticuerpo monoclonal de la presente invención puede ser cualquiera de ellas.

Un anticuerpo humano es originalmente un anticuerpo que existe de forma natural en el cuerpo humano, y también incluye anticuerpos obtenidos a partir de una biblioteca de fagos de anticuerpos humanos o de un animal transgénico que produce anticuerpo humano, que se prepara en base al avance reciente en técnicas de ingeniería genética, ingeniería celular e ingeniería de desarrollo.

El anticuerpo que existe de forma natural en el cuerpo humano se puede preparar, por ejemplo, aislando un linfocito de sangre periférica humana, inmortalizándolo al infectarlo con el virus de EB o similar, y clonándolo entonces para obtener de ese modo linfocitos capaces de producir el anticuerpo, cultivando los linfocitos así obtenidos, y purificando el anticuerpo a partir del sobrenadante del cultivo.

La biblioteca de fagos de anticuerpos humanos es una biblioteca en la que fragmentos de anticuerpo, tales como FAB y scFv, son expresados en la superficie del fago al insertar en un gen del fago un gen que codifica un anticuerpo preparado a partir de una célula B humana. Un fago que expresa un fragmento de anticuerpo que tiene la actividad de unión al antígeno deseada se puede recuperar de la biblioteca, usando como índice su actividad para unirse a un sustrato con antígeno inmovilizado. El fragmento de anticuerpo se puede convertir posteriormente en una molécula de anticuerpo humano que comprende dos cadenas H completas y dos cadenas L completas mediante técnicas de ingeniería genética.

Un animal transgénico que produce un anticuerpo humano es un animal en el que un gen de anticuerpo humano se integra en las células. Específicamente, un animal transgénico que produce un anticuerpo humano se puede preparar introduciendo en una célula ES de ratón un gen que codifica un anticuerpo humano, injertando la célula ES en un embrión de etapa temprana de otro ratón y haciendo entonces que se desarrolle (Tomizuka. et al., Proc Natl Acad Sci USA., 2000 Vol. 197:722). Un anticuerpo humano se prepara a partir del animal no humano transgénico productor del anticuerpo humano obteniendo un hibridoma productor del anticuerpo humano usando un método de preparación de hibridomas llevado a cabo habitualmente en mamíferos no humanos, cultivando el hibridoma obtenido, y formando y acumulando el anticuerpo humano en el sobrenadante del cultivo.

En la presente invención, el anticuerpo monoclonal que se une a CD40 humano comprende una región constante de cadena pesada, IgG2-AAS. Se ha encontrado, como se muestra en los Ejemplos, que el anticuerpo IgG2-AAS muestra una actividad agonista mayor que un anticuerpo (en adelante denominado en la presente memoria también como "anticuerpo IgG2-S") que comprende una región constante de cadena pesada que es IgG2 (en adelante denominada en la presente memoria como "IgG2-S"), en la que la prolina en la posición 331 está sustituida por serina (el número se basa en el índice EU de Kabat et al.).

Además, como se muestra mediante los Ejemplos, se encontró que el anticuerpo IgG2-AAS(341), que fue uno de los anticuerpos monoclonales de la invención, tuvo un efecto prolongando el tiempo de permanencia en sangre en comparación con el anticuerpo IgG2-S(341). También, se encontró además que el anticuerpo IgG2-AAS(341) tuvo un efecto de manera que la toxicidad para el hígado se redujo en comparación con el anticuerpo IgG2-S(341).

Se sabe que el ligando de CD40 muestra toxicidad para el hígado (Journal of Clinical Oncology, 19 (13), 3280 - 3287 (2001)) y, de forma similar, se sabe que un anticuerpo monoclonal que se une a CD40 que muestra actividad agonista también muestra toxicidad para el hígado (American Journal of Pathology, 168(3), 786 - 795 (2006)). Aunque la actividad agonista del anticuerpo IgG2-AAS de la invención está potenciada en comparación con el anticuerpo IgG2-S, su toxicidad para el hígado está reducida en comparación con el anticuerpo IgG2-S. La reducción de la toxicidad se puede confirmar tal como mediante la disminución de la concentración en sangre de aspartato aminotransferasa (en adelante denominada en la presente memoria también como AST) o alanina aminotransferasa (en adelante denominada en la presente memoria también como ALT). El anticuerpo de la presente descripción incluye un anticuerpo en el que uno o más restos de aminoácidos están suprimidos, añadidos, sustituidos y/o insertados en la secuencia de aminoácidos que constituye el anticuerpo monoclonal mencionado anteriormente y

que tiene una actividad similar al anticuerpo mencionado anteriormente. La posición en la que se introduce la adición, sustitución y/o inserción puede existir específicamente en una región constante de cadena pesada, una región constante de cadena ligera, una región variable de cadena pesada o una región constante de cadena ligera; más específicamente, CDR1, CDR2 o CDR3, o una región estructural de armazón (FR) de la cadena pesada y cadena ligera anteriores de la región variable.

El número de aminoácidos que se suprimen, sustituyen, insertan y/o añaden es uno o más, y no está específicamente limitado, pero está en el intervalo en el que es posible la supresión, sustitución o adición mediante métodos conocidos tales como la mutagénesis dirigida al sitio descrita en Molecular Cloning, 2ª Edición; Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997); Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982); Gene, 34, 315 (1985), Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985) o similar. Por ejemplo, el número es 1 a docenas, preferiblemente 1 a 20, más preferiblemente 1 a 10, y lo más preferible 1 a 5 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5), distintas de las sustituciones de valina en posición 234 por alanina, glicina en la posición 237 por alanina, y prolina en la posición 331 por serina.

Por lo tanto, en la presente descripción, el resto de aminoácido se puede suprimir, añadir, sustituir y/o insertar excepto para la sustitución de AAS en la región constante de cadena pesada, IgG2-AAS; y el anticuerpo monoclonal de la presente invención incluye un anticuerpo monoclonal que comprende tal región constante de cadena pesada.

La expresión "uno o más restos de aminoácidos se suprimen, sustituyen, insertan y/o añaden", en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anterior, significa lo siguiente. Esto es, significa que hay supresión, sustitución, inserción o adición de uno o más aminoácidos en posiciones opcionales en la misma secuencia y una o más secuencias de aminoácidos. También, la supresión, sustitución, inserción o adición puede ocurrir al mismo tiempo, y el aminoácido que es sustituido, insertado o añadido puede ser de tipo natural o de un tipo no natural. El aminoácido de tipo natural incluye L-alanina, L-asparagina, ácido L-aspartico, L-glutamina, ácido L-glutámico, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina, L-cisteína y similar.

Más abajo se muestran ejemplos preferibles de aminoácidos mutuamente sustituibles. Los aminoácidos en el mismo grupo son mutuamente sustituibles.

Grupo A: leucina, isoleucina, norleucina, valina, norvalina, alanina, ácido 2-aminobutanoico, metionina, O-metilserina, t-butilglicina, t-butilalanina, ciclohexilalanina

Grupo B: ácido aspártico, ácido glutámico, ácido isoaspártico, ácido isoglutámico, ácido 2-aminoadípico, ácido 2-aminosubérico

Grupo C: asparagina, glutamina

Grupo D: lisina, arginina, ornitina, ácido 2,4-diaminobutanoico, ácido 2,3-diaminopropiónico

Grupo E: prolina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina

Grupo F: serina, treonina, homoserina

Grupo G: fenilalanina, tirosina

El anticuerpo de la presente invención incluye un conjugado de anticuerpo en el que un anticuerpo monoclonal que se une a la región extracelular de CD40 está unido química o genéticamente a un radioisótopo, un agente que tiene bajo peso molecular, un agente que tiene peso molecular elevado, una proteína tal como anticuerpo, y similar.

El derivado de anticuerpo de la presente invención se puede producir conjugando químicamente un radioisótopo, un agente que tiene un peso molecular bajo, un agente que tiene un peso molecular elevado, un inmunestimulante, una proteína, o similar, al lado N-terminal o al lado C-terminal de una cadena H o una cadena L del anticuerpo monoclonal que se une a la región extracelular de CD40 en la presente invención, un sustituyente apropiado o cadena lateral del anticuerpo, una cadena de azúcar en el anticuerpo, o similar [Antibody Engineering Handbook, editado por Osamu Kanemitsu, publicado por Chijin Shokan (1994)].

También, el derivado de anticuerpo de la presente invención se puede producir genéticamente usando una técnica genética, tal como enlazando un ADN que codifica el anticuerpo monoclonal que se une a la región extracelular de CD40 en la presente invención a otro ADN que codifica una proteína a conjugar o un anticuerpo terapéutico, insertando el ADN en un vector de expresión, e introduciendo el vector de expresión en una célula hospedante apropiada para expresar el derivado.

El radioisótopo incluye ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y, ⁶⁴Cu, ¹⁹⁹Tc, ⁷⁷Lu, ²¹¹At, y similar. El radioisótopo se puede conjugar directamente con el anticuerpo mediante el método de la cloramina T. También, una sustancia quelante del radioisótopo se puede

conjugar con el anticuerpo. El agente quelante incluye ácido metilbencildietilen-triaminopentaacético (MX-DTPA), y similar.

El agente que tiene peso molecular bajo incluye un agente antitumoral tal como un agente alquilante, un agente de nitrosourea, un antagonista del metabolismo, una sustancia antibiótica, un alcaloide derivado de una planta, un inhibidor de topoisomerasa, un agente para hormonoterapia, un antagonista de hormonas, un inhibidor de aromatasa, un inhibidor de glicoproteína P, un derivado de un complejo de platino, un inhibidor de la fase M y un inhibidor de cinasa [Rinsho Syuyo-gaku (Clinical Oncology), Gan to Kagaguryoho-Sha (1996)], un agente esteroideo tal como hidrocortisona y prednisona, un agente no esteroideo tal como aspirina e indometacina, un agente que regula el sistema inmune tal como ciclofosfamida y azatioprina, un agente antiinflamatorio tal como un agente antihistamínico (por ejemplo, maleato de clorfeniramina y clemastina [Ensho to Kouensho-Ryoho (Inflammation and Anti-inflammation Therapy), Ishiyaku Shuppan (1982)], y similar.

Los ejemplos del agente antitumoral incluyen amifostina (Etiol), cisplatino, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, mecloretamina (mostaza de nitrógeno), estreptozocina, ciclofosfamida, ifosfamida, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), doxorubicina (adriamicina), epirubicina, gemcitabina (Gemsal), daunorubicina, procarbazona, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, 5-fluorouracilo, fluorouracilo, vinblastina, vincristina, bleomicina, daunomicina, peplomycin, estramustina, paclitaxel (Taxol), docetaxel (Taxotex), aldesleucina, asparaginasa, busulfano, carboplatino, oxaliplatino, nedaplatino, cladribina, camptotecina, 10-hidroxi-7-etilcamptotecina (SN38), flouxuridina, fludarabina, hidroxurea, ifosfamida, idarrubicina, mesna, irinotecán (CPT-11), nogitecán, mitoxantrona, topotecán, leuprolida, megestrol, melfalán, mercaptopurina, hidroxycarbamida, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobromano, estreptozocina, tamoxifeno, goserelina, leuprorrelina, flutamida, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, clorambucilo, hidrocortisona, prednisolona, metilprednisolona, vindesina, nimustina, semustina, capecitabina, Tomudex, azacitidina, UFT, oxaliplatino, gefitinib (Iressa), imatinib (STI 571), elrotinib, inhibidor de tirosina cinasa 3 similar a FMS (Flt3), inhibidor del receptor del factor del crecimiento endotelial vascular (VEGFR), inhibidor del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), tal como Iressa y Tarceva, radicol, 17-alilamino-17-desmetoxigeldanamina, rapamicina, amsacrina, ácido todo-trans-retinoico, talidomida, lenalidomida, anastrozol, fadrozol, letrozol, exemestano, tiomalato de oro, D-penicilamina, bucilamina, azatioprina, mizoribina, ciclosporina, rapamicina, hidrocortisona, bexaroteno (Targretin), tamoxifeno, dexametasona, sustancias progestágenas, sustancias estrogénicas, anastrozol (Arimidex), Leuplin, aspirina, indometacina, celecoxib, azatioprina, penicilamina, tiomalato de oro, maleato de clorfeniramina, clorfeniramina, clemastina, tretinoína, bexaroteno, arsénico, voltezomib, alopurinol, caliqueamicina, ibritumomab tiuxetano, Targretin, ozogamina, claritromicina, leucovorina, ifosfamida, ketoconazol, aminoglutetimida, suramina, metotrexato, maitansinoide y sus derivados.

El método para conjugar el agente con el anticuerpo incluye un método en el que el agente quimioterapéutico que tiene peso molecular bajo y un grupo amino del anticuerpo se conjugan vía glutaraldehído, un método en el que un grupo amino del agente quimioterapéutico y un grupo carboxilo del anticuerpo se unen vía carbodiimida soluble en agua, y similar.

El agente que tiene peso molecular elevado incluye polietilenglicol (en adelante denominado en la presente memoria como "PEG"), albúmina, dextrano, polioxietileno, copolímero de estireno-ácido maleico, polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, hidroxipropilmetacrilamida, y similar. Al unir estos compuestos que tienen peso molecular elevado a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, se esperan los siguientes efectos: (1) mejora de la estabilidad frente a diversos factores químicos, físicos o biológicos, (2) prolongación notable de la semivida en sangre, (3) desaparición de la inmunogenicidad, supresión de la producción de anticuerpo, y similar [Bioconjugate Drug, Hirokawa Shoten (1993)]. Por ejemplo, el método para unir PEG a un anticuerpo incluye un método en el que se deja reaccionar un anticuerpo con un reactivo modificador de PEG [Bioconjugate Drug, Hirokawa Shoten (1993)]. El reactivo modificador de PEG incluye un agente modificador de grupo ε-amino de lisina (Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 178926/86), un agente modificador de un grupo carboxilo de ácido aspártico y ácido glutámico (Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 23587/81), un agente modificador de un grupo guanidino de arginina (Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 117920/90), y similar.

El inmunoestimulante incluye un producto natural conocido como inmunoadyuvante. Los ejemplos específicos incluyen un agente para estimular la inmunidad, por ejemplo β(1→3)glucano (tal como lentinano y esquizofilano), α-galactosilceramida, y similar.

Ejemplos de la proteína incluyen citosina o factor de crecimiento que estimula células inmunocompetentes tales como célula NK, macrófago y neutrófilo; proteína tóxica; y similares.

Ejemplos de la citosina o del factor de crecimiento incluyen interferón (en adelante denominado en la presente memoria como "INF")-α, INF-β, INF-γ, interleucina (en adelante denominada en la presente memoria como "IL")-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), y similares. La proteína tóxica incluye ricina, toxina de la difteria, ONTAK, y similar, y también incluye una proteína tóxica en la que se introduce una mutación en la proteína a fin de controlar la toxicidad.

El anticuerpo terapéutico incluye un anticuerpo frente a un antígeno en el que se induce apoptosis mediante unión del anticuerpo, un anticuerpo frente a un antígeno que participa en la formación de la parte mórbida del tumor, un anticuerpo que regula la función inmunológica, y un anticuerpo relacionado con la angiogénesis en la parte mórbida.

El antígeno en el que se induce apoptosis mediante unión del anticuerpo incluye cúmulo de diferenciación (en adelante en la presente memoria "CD") 19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80 (B7.1), CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85, CD86 (B7.2), antígeno leucocitario humano (HLA) Clase II, Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR), y similar.

El antígeno para el que el anticuerpo regula la función inmunológica incluye CD40, ligando de CD40, molécula de la familia B7 (CD80, CD86, CD274, B7-DC, B7-H2, B7-H3, B7-H4, etc.), ligando de molécula de la familia B7 (CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1, BTLA, etc.), OX-40, ligando de OX-40, CD 137, molécula de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) (DR4, DR5, TNFR1, TNFR2, etc.), molécula de la familia del receptor del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL), familia de receptores de molécula de la familia de TRAIL (TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, etc.), receptor activador del factor nuclear kappa B (RANK), ligando de RANK, CD25, receptor 4 de ácido fólico, citocina [IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, factor de crecimiento transformante (TGF) β , TNF α , etc.], receptores de estas citocinas, quimiocina (SLC, ELC, I-309, TARC, MDC, CTACK, etc.) y receptores de estas quimiocinas.

El antígeno para el anticuerpo que inhibe la angiogénesis en la parte mórbida incluye factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyetina, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), EGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento similar a insulina (IGF), eritropoyetina (EPO), TGF β , IL-8, efilina, SDF-1, y similar.

Un cuerpo de fusión con una proteína, tal como un anticuerpo terapéutico, se puede producir enlazando un ADNc que codifica un anticuerpo monoclonal a un ADNc que codifica la proteína, construyendo un ADN que codifica el anticuerpo de fusión, insertando el ADN en un vector de expresión para procarionota o eucariota, e introduciendo entonces el vector de expresión en un procarionota o eucariota para expresar el anticuerpo de fusión.

Cuando el derivado de anticuerpo anterior se usa en un método de detección, un método de determinación, se usa como un reactivo de detección, un reactivo de determinación o un reactivo de diagnóstico, los ejemplos del agente para la unión al anticuerpo monoclonal que se une a la región extracelular de CD40 incluyen un método en el que se usa un marcador específico marcando el anticuerpo de la presente invención. El marcador incluye un marcador que se usa en el método de medida o de detección inmunológica general, y los ejemplos incluyen enzimas tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa y luciferasa, materiales luminiscentes tales como éster de acridinio y lofina, materiales fluorescentes tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC) e isotiocianato de tetrametilrodamina (RITC), y similares.

Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica y a un agente terapéutico que comprenden un anticuerpo monoclonal que se une a una región extracelular de CD40, como principio activo. La enfermedad no está limitada en tanto que sea una enfermedad para la que un anticuerpo anti-CD40 que tiene actividad agonista es terapéuticamente eficaz. Los ejemplos de las enfermedades incluyen infecciones (causadas por, por ejemplo, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis A, virus de la gripe, *Listeria monocytogenes*, bacilo de la tuberculosis, malaria plasmodium o *Toxoplasma gondii*) y tumores malignos, puesto que el anticuerpo anti-CD40 que tiene actividad agonista induce inmunidad mediada por células e inmunidad mediada humoralmente como se describe anteriormente. En el caso en el que las propias células cancerosas en un tumor maligno expresen CD40, el tumor maligno también se puede tratar a través de la inducción de apoptosis celular mediante el anticuerpo anti-CD40 que tiene actividad agonista. Los ejemplos de tumores malignos incluyen linfoma maligno, melanoma maligno, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer faríngeo, mesotelioma, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer esofágico, cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células gástricas, cáncer de próstata, cáncer uterino y cáncer ovárico.

El agente terapéutico de la presente invención comprende como principio activo el anticuerpo monoclonal anterior.

El agente terapéutico que comprende el anticuerpo se suministra preferiblemente como una preparación farmacéutica producida mediante un método apropiado bien conocido en el campo técnico de la farmacia, mezclándolo con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

Se prefiere seleccionar una vía de administración que sea la más eficaz en el tratamiento. Los ejemplos incluyen la administración oral y administración parenteral, tal como la administración bucal, traqueal, rectal, subcutánea, intramuscular o intravenosa. En el caso de una formulación de anticuerpo o peptídica, se prefiere la administración intravenosa. La forma de dosificación incluye pulverizaciones, cápsulas, comprimidos, gránulos, jarabes, emulsiones, supositorios, inyecciones, ungüentos, cintas, y similares.

Aunque la dosis o la frecuencia de administración varía dependiendo del efecto terapéutico objetivo, del método de

administración, del período de tratamiento, de la edad, del peso corporal, y similar, habitualmente es 10 µg/kg a 10 mg/kg por día y por adulto.

5 Además, la presente invención se refiere a un método para detectar o medir inmunológicamente CD40, a un reactivo para detectar o medir inmunológicamente CD40, a un método para detectar o medir inmunológicamente una célula que expresa CD40, y a un agente de diagnóstico para diagnosticar una enfermedad relacionada con células positivas para CD40, que comprende como principio activo un anticuerpo monoclonal que se une a la región extracelular de CD40.

10 En la presente invención, los ejemplos del método para detectar o medir CD40 incluyen cualquier método conocido. Los ejemplos incluyen el método de detección inmunológica o medición inmunológica y similar.

15 El método de detección inmunológica o medición inmunológica es un método en el que una cantidad de anticuerpo o una cantidad de antígeno se detecta o determina usando un antígeno o anticuerpo marcado. Los ejemplos de la detección inmunológica o medición inmunológica son método de inmunoanticuerpo marcado con sustancia radioactiva (RIA), inmunoensayo enzimático (EIA o ELISA), inmunoensayo fluorescente (FIA), inmunoensayo luminiscente, método de transferencia Western, medio fisicoquímico, y similar.

20 Al detectar o medir la célula que expresa CD40 usando el anticuerpo monoclonal de la presente invención, se puede diagnosticar la enfermedad relacionada con CD40.

25 Para la detección de la célula que expresa el polipéptido, se pueden usar métodos de detección inmunológica conocidos, y preferiblemente se usa un método de inmunoprecipitación, un método de tinción celular fluorescente, un método de tinción tisular inmune, y similar. También, se puede usar un método de tinción inmunofluorescente usando el sistema FMAT 8100 HTS (Applied Biosystem), y similar.

30 La muestra corporal viviente a usar para la detección o medida de CD40 en la presente invención no está particularmente limitada, en tanto que tenga la posibilidad de contener CD40, tal como células de tejidos, sangre, plasma sanguíneo, suero, jugo pancreático, orina, materia fecal, fluido tisular o medio de cultivo.

35 El reactivo de diagnóstico que comprende el anticuerpo de la presente invención puede contener además un reactivo para llevar a cabo una reacción antígeno-anticuerpo, o un reactivo para la detección de la reacción, dependiendo del método de diagnóstico deseado. El reactivo para llevar a cabo la reacción antígeno-anticuerpo incluye un tampón, una sal, y similar. El reactivo para la detección incluye un reactivo usado para la detección inmunológica o inmunoensayo habitual, tal como un anticuerpo secundario marcado para reconocer el anticuerpo y un sustrato que corresponde al marcaje.

40 Más abajo se describe específicamente un procedimiento para producir el anticuerpo de la presente invención, un método para tratar la enfermedad, y un método para diagnosticar la enfermedad.

1. Preparación de anticuerpo monoclonal

(1) Preparación de antígeno

45 CD40 como antígeno, o una célula que expresa CD40, se puede aislar introduciendo un vector de expresión que comprende ADNc que codifica una longitud total o longitud parcial de CD40 en *Escherichia coli*, levadura, una célula de insecto, una célula de mamífero, o similar. También, CD40 se puede obtener mediante purificación a partir de diversas células de cultivo tumoral humanas, tejido humano, y similar, que expresan una gran cantidad de CD40. Además, la célula de cultivo tumoral, el tejido o similar se puede usar como un antígeno. Además, un péptido sintético que tiene una secuencia parcial de CD40 se puede preparar usando un método de síntesis química, tal como un método de Fmoc y un método de tBoc, y se puede usar como un antígeno.

50 CD40 usado en la presente invención se puede producir, por ejemplo, usando el siguiente método para expresar en una célula hospedante un ADN que codifica CD40.

55 En primer lugar, un vector recombinante se prepara introduciendo un ADNc de longitud completa en dirección 3' de un promotor de un vector de expresión apropiado. En este momento, si es necesario, un fragmento de ADN que tiene una longitud apropiada que contiene una región que codifica el polipéptido en base al ADNc de longitud completa, y el fragmento de ADN se puede usar en lugar del ADNc de longitud completa anterior. A continuación, un transformante que produce el polipéptido se puede obtener introduciendo el vector recombinante en una célula hospedante adecuada para el vector de expresión.

60 El vector de expresión incluye vectores que se pueden replicar autónomamente en la célula hospedante a usar, o vectores que se pueden integrar en un cromosoma que comprende un promotor apropiado en una posición de manera que se puede transcribir el ADN que codifica la porción que codifica el polipéptido.

65

La célula hospedante puede ser una cualquiera, en tanto que pueda expresar el gen de interés, e incluye *Escherichia coli*, levadura, una célula de insecto, una célula de animal, y similar.

5 Cuando un procarionta tal como una *Escherichia coli* se usa como la célula hospedante, se prefiere que el vector recombinante sea autónomamente replicable en el procarionta y contenga un promotor, una secuencia de unión del ribosoma, el ADN que codifica CD40, y una secuencia de terminación de la transcripción. El vector recombinante no tiene que tener necesariamente una secuencia de terminación de la transcripción, pero una secuencia de terminación de la transcripción se establece preferiblemente justo debajo del gen estructural. Además, el vector recombinante puede comprender además un gen que regula el promotor.

10 También, el vector recombinante anterior es preferiblemente un plásmido en el que el espacio entre la secuencia de Shine-Dalgarno (también denominada como secuencia SD), que es la secuencia de unión del ribosoma, y el codón de iniciación se ajusta a una distancia apropiada (por ejemplo, 6 a 18 nucleótidos).

15 Además, la secuencia nucleotídica del ADN que codifica CD40 se puede sustituir por otra base de manera que sea un codón adecuado para la expresión en una célula hospedante, mejorando de ese modo la productividad del CD40 objetivo.

20 Los vectores de expresión incluyen, por ejemplo, pBTrp2, pBTac1, pBTac2 (todos fabricados por Roche Diagnostics), pKK233-2 (fabricado por Pharmacia), pSE280 (fabricado por Invitrogen), pGEMEX-1 (fabricado por Promega), pQE-8 (fabricado por QIAGEN), pKYP10 (Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 110600/83), pKYP200 [Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)], pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)], pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82,4306 (1985)], pBluescript II SK(-) (fabricado por Stratagene), pTrs30 [preparado a partir de *Escherichia coli* JM109/pTrs30 (FERM BP-5407)], pTrs32 [preparado a partir de *Escherichia coli* JM109/pTrs32 (FERM BP-5408)], pGHA2 [preparado a partir de *Escherichia coli* IGHA2 (FERM BP-400), Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 221091/85], pGKA2 [preparado a partir de *Escherichia coli* IGKA2 (FERM BP-6798), Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 221091/85], pTerm2 (documentos US4686191, US4939094, US5160735), pSupex, pUB 110, pTP5, pC194, pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)], pGEX (fabricado por Pharmacia), sistema pET (fabricado por Novagen), pME18SFL3, y similares.

30 Se puede usar cualquier promotor, en tanto que pueda funcionar en la célula hospedante a usar. Los ejemplos incluyen promotores derivados de *Escherichia coli*, fago y similar, tal como el promotor trp (P_{trp}), promotor lac, promotor PL, promotor PR y promotor T7. También, se pueden usar promotores diseñados artificialmente y modificados, tales como un promotor en el que dos P_{trp} están enlazados en tándem, promotor tac, promotor lacT7 y promotor letI.

40 Los ejemplos de la célula hospedante incluyen *Escherichia coli* XL1-Blue, *Escherichia coli* XL2-Blue, *Escherichia coli* DHI, *Escherichia coli* MC1000, *Escherichia coli* KY3276, *Escherichia coli* W1485, *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* HB101, *Escherichia coli* nº 49, *Escherichia coli* W3110, *Escherichia coli* NY49, *Escherichia coli* DH5 α , y similares.

45 Se puede usar cualquier método de introducción del vector recombinante, en tanto que sea un método para introducir ADN en la célula hospedante descrita anteriormente, y los ejemplos incluyen un método que usa unión de calcio descrito en Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972), métodos descritos en Gene, 17, 107 (1982) y Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979), y similares.

50 Cuando se usa una célula de animal como la célula hospedante, un vector de expresión incluye, por ejemplo, pcDNA1, pcDM8 (disponible de Funakoshi), pAGE107 [Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 22979/91; Cytotechnology, 3, 133 (1990)], pAS3-3 (Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 227075/90), pCDM8 [Nature, 329, 840,(1987)], pcDNA1/Amp (fabricado por Invitrogen), pREP4 (fabricado por Invitrogen), pAGE103 [J. Biochemistry, 101, 1307 (1987)], pAGE210, pME18SFL3, pKANTEX93 (documento WO 97/10354), y similares.

55 Se puede usar cualquier promotor, en tanto que pueda funcionar en una célula de animal. Los ejemplos incluyen un promotor del gen IE (temprano inmediato) de citomegalovirus (CMV), promotor temprano de SV40, un promotor de retrovirus, un promotor de metalotioneína, un promotor de choque térmico, promotor SR α , y similares. También, el potenciador del gen IE del CMV humano se puede usar junto con el promotor.

60 La célula hospedante incluye célula Namalwa de leucemia humana, célula COS de mono, célula de ovario de hámster chino (CHO) (Journal of Experimental Medicine, 108, 945 (1958); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 1275 (1968); Genetics, 55, 513 (1968); Chromosoma, 41, 129 (1973), Methods in Cell Science, 18, 115 (1996); Radiation Research, 148, 260 (1997); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 1275 (1968); Cell, 6, 121 (1975); Molecular Cell Genetics, Appendix I, II (p. 883-900)), CHO/DG44, CHO-K1 (ATCC CCL-61), DukXB11 (ATCC CCL-9096), Pro-5 (ATCC CL-1781), CHO-S (nº de Catálogo de Life Technologies 11619), Pro-3, célula de mieloma de rata YB2/3HL.P2.G11.16AG.20 (denominada como YB2/0), célula de mieloma de ratón NS0, célula de mieloma de ratón SP2/0-Ag14, célula de hámster sirio BHK o, HBT5637 (Solicitud de Patente

Japonesa Publicada Sin Examinar nº 299/88), y similar.

5 Se puede usar cualquier método de introducción del vector recombinante, en tanto que sea un método para introducir ADN en una célula de animal, y los ejemplos incluyen electroporación [Cytotechnology, 3, 133 (1990)], el método de fosfato de calcio (Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 227075/90), el método de lipofección [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)], y similares.

10 CD40 se puede producir cultivando en un medio el transformante derivado de un microorganismo, una célula de animal o similar que tiene un vector recombinante que comprende ADN que codifica CD40 obtenido mediante el procedimiento descrito anteriormente para formar y acumular CD40 en el cultivo, y recuperándolo del cultivo. El método para cultivar el transformante en el medio se lleva a cabo según el método habitual usado en el cultivo de hospedantes.

15 Cuando el vector se expresa en una célula derivada de un eucariota, se puede obtener CD40 al que se unen azúcares o cadenas de azúcares.

20 Cuando se cultiva un microorganismo transformado con un vector recombinante que contiene como promotor un promotor inducible, se puede añadir un inductor al medio, si es necesario. Por ejemplo, se puede añadir al medio isopropil- β -D-tiogalactopiranosido o similar cuando se cultiva un microorganismo transformado con un vector recombinante usando el promotor *lac*; o se le puede añadir ácido indolacrilico o similar cuando se cultiva un microorganismo transformado con un vector recombinante usando el promotor *trp*.

25 Cuando se cultiva un transformante obtenido usando como célula hospedante una célula de animal, el medio incluye medio RPMI 1640 usado generalmente [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)], medio MEM de Eagle [Science, 122, 501 (1952)], medio MEM modificado de Dulbecco [Virology, 8, 396 (1959)] y medio 199 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)], medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM), los medios a los que se añade suero fetal de ternera, etc., y similar. El cultivo se lleva a cabo generalmente a un pH de 6 a 8 y 30 a 40°C durante 1 a 7 días en presencia de 5% de CO₂. Si es necesario, durante el cultivo se puede añadir al medio un antibiótico tal como canamicina o penicilina.

30 Con respecto al método de expresión del gen que codifica CD40, además de la expresión directa, se puede llevar a cabo la producción secretora, la expresión de proteínas de fusión, y similar, según el método descrito en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

35 El procedimiento para producir CD40 incluye un método de expresión intracelular en una célula hospedante, un método de secreción extracelular a partir de una célula hospedante, un método de producción sobre una cubierta exterior de membrana de célula hospedante, y similar. El método apropiado se puede seleccionar cambiando la célula hospedante usada y la estructura del polipéptido producido.

40 Cuando CD40 se produce en una célula hospedante o sobre una cubierta exterior de membrana de célula hospedante, CD40 se puede segregar positivamente de forma extracelular según el método de Paulson et al. [J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)], el método de Lowe et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989), Genes Develop., 4, 1288 (1990)], los métodos descritos en la Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 336963/93 y en el documento WO 94/23021, y similares.

45 También, la cantidad de producción se puede incrementar según el método descrito en la Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 227075/90 utilizando un sistema de amplificación génica que usa un gen de dihidrofolato reductasa.

50 CD40 se puede aislar y purificar del cultivo anterior, por ejemplo, según lo siguiente.

55 Cuando CD40 se expresa intracelularmente en un estado disuelto, las células, tras el cultivo, se recuperan mediante centrifugación, se suspenden en un tampón acuoso y entonces se rompen usando un aparato de ultrasonidos, una prensa francesa, un homogeneizador de Manton Gaulin, dinomil o similar, para obtener un extracto libre de células. El extracto libre de células se centrifuga para obtener un sobrenadante, y se puede obtener una preparación purificada sometiendo el sobrenadante a técnicas generales de aislamiento y purificación de enzimas, tal como extracción con disolventes; desalado con sulfato de amonio, etc.; extracción de sales; precipitación con un disolvente orgánico; cromatografía de intercambio iónico usando una resina tal como dietilaminoetil (DEAE)-sefarosa, DIAION HPA-75 (fabricada por Mitsubishi Chemical); cromatografía de intercambio catiónico usando una resina tal como S-sefarosa FF (fabricada por Pharmacia); cromatografía hidrófoba usando una resina tal como butil-sefarosa o fenil-sefarosa; filtración en gel usando un tamiz molecular; cromatografía de afinidad; cromatoenfoque; electroforesis tal como enfoque isoelectrico; y similar, que se pueden usar solas o en combinación.

65 Cuando CD40 se expresa de forma intracelular formando un cuerpo de inclusión, las células se recuperan, se destruyen y se centrifugan de la misma manera, y el cuerpo de inclusión de CD40 se recupera como una fracción de precipitación. El cuerpo de inclusión de la proteína recuperado se solubiliza con un agente que desnaturaliza la

proteína. La proteína se obtiene en una estructura tridimensional normal diluyendo o dializando la disolución solubilizada, y entonces se obtiene un producto de CD40 purificado mediante el mismo método de aislamiento y purificación como antes.

5 Cuando CD40 o el derivado tal como un producto glicosilado se segrega extracelularmente, CD40 o el derivado tal como un producto glicosilado se puede recuperar del sobrenadante del cultivo. Esto es, el cultivo se trata mediante un método tal como centrifugación de la misma manera como antes para obtener un sobrenadante de cultivo a partir del cual se eliminan los sólidos, y se puede obtener un producto purificado de CD40 a partir del sobrenadante de cultivo mediante el mismo método de aislamiento y purificación como antes.

10 También, CD40 usado en la presente invención se puede producir mediante un método de síntesis química, tal como un método de Fmoc o método de tBoc. También, se puede sintetizar químicamente usando un sintetizador de péptidos fabricado por Advanced ChemTech, Perkin-Elmer, Pharmacia, Protein Technology Instrument, Synthecell-Vega, PerSeptive, Shimadzu Corporation, o similar.

15 (2) Inmunización del animal y preparación de la célula productora de anticuerpo para fusión

Un ratón, rata o hámster de 3 a 20 semanas se inmuniza con el antígeno preparado en el (1) anterior, y las células productoras de anticuerpo se recogen del bazo, ganglio linfático o sangre periférica del animal. También, cuando el incremento de un título suficiente en el animal anterior no es reconocido debido a una baja inmunogenicidad, se puede usar como animal a inmunizar un ratón genosuprimido para CD40.

20 La inmunización se lleva a cabo administrando el antígeno al animal a través de inyección subcutánea, intravenosa o intraperitoneal junto con un adyuvante apropiado (por ejemplo, adyuvante completo de Freund, combinación de gel de hidróxido de aluminio con vacuna de pertussis, o similar). Cuando el antígeno es un péptido parcial, se produce un conjugado con el péptido parcial y una proteína portadora tal como BSA (seroalbúmina bovina), KLH (hemocianina de lapa californiana) o similar, que se usa como el antígeno.

25 La administración del antígeno se lleva a cabo 5 a 10 veces cada semana o cada dos semanas después de la primera administración. En el tercer a séptimo día después de cada administración, se recoge una muestra de sangre del fondo del ojo, se ensaya la reactividad del suero con el antígeno, por ejemplo mediante inmunoensayo enzimático [Antibodies-A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory (1988)], o similar. Un ratón, rata o hámster que muestre un título suficiente de anticuerpos en sus sueros frente al antígeno usado para la inmunización se usa como la fuente de suministro de una célula productora de anticuerpo para fusión.

30 En la fusión de las células productoras de anticuerpo y células de mieloma, en los días tercero a séptimo después de la administración final del antígeno, el tejido que contiene las células productoras de anticuerpo, tal como el bazo procedente del ratón, rata o hámster inmunizado, se corta para recolectar la célula productora de anticuerpo. Cuando se usan esplenocitos, el bazo se retira mediante corte y se libera, seguido de la centrifugación. Después, las células productoras de anticuerpo para la fusión se obtienen eliminando los eritrocitos.

35 (3) Preparación de célula de mieloma

Como células de mieloma, se usa una estirpe celular establecida obtenida del ratón. Los ejemplos incluyen la estirpe de célula de mieloma de ratón resistente a 8-azaguanina (derivado de ratón BALB/c) P3-X63Ag8-U1 (P3-U1) [Current Topics in Microbiology and Immunology, 18, 1-7 (1978)], P3-NS1/1-Ag41 (NS-1) [European J. Immunology, 6, 511-519 (1.976)], SP2/0-Ag14 (SP-2) [Nature, 276,269-270 (1978)], P3-X63-Ag8653 (653) [J. Immunology, 123,1548-1550 (1979)], P3-X63-Ag8 (X63) [Nature, 256, 495-497 (1975)], y similares.

40 Estas estirpes celulares se subcultivan en un medio normal [un medio en el que se añaden glutamina, 2-mercaptoetanol, gentamicina, FBS y 8-azaguanina al medio RPMI-1640], y se subcultivan en el medio normal 3 o 4 días antes de la fusión celular, para asegurar el número de células de 2×10^7 o más en el día para la fusión.

45 (4) Fusión celular y preparación de hibridoma para producir anticuerpo monoclonal

50 Las células productoras de anticuerpo para la fusión obtenidas en el (2) anterior y las células de mieloma obtenidas en el (3) anterior se lavaron suficientemente con Medio Esencial Mínimo (MEM) o PBS (1,83 g de hidrogenofosfato disódico, 0,21 g de dihidrogenofosfato potásico, 7,65 g de cloruro de sodio, 1 litro de agua destilada, pH 7,2), y se mezclaron para dar una relación de las células productoras de anticuerpo:las células de mieloma = 5 a 10:1, seguido de centrifugación. Después, el sobrenadante se descartó. El grupo de células precipitadas se liberó suficientemente. Tras liberar la célula precipitada, la mezcla de polietilenglicol-1000 (PEG-1000), medio MEM y dimetilsulfóxido se añadió a la célula bajo agitación a 37°C. Además, se añadieron 1 a 2 ml de medio MEM varias veces cada uno o dos minutos, y se añadió medio MEM para dar una cantidad total de 50 ml. Tras la centrifugación, el sobrenadante se descartó. Después de que el grupo de células precipitadas se liberó suavemente, las células se suspendieron suavemente en medio HAT [un medio en el que se añaden hipoxantina, timidina y aminopterina al medio normal]. La suspensión se cultiva en una incubadora con 5% de CO₂ durante 7 a 14 días a 37°C.

Tras el cultivo, se muestrea una porción del sobrenadante de cultivo y se selecciona un hibridoma que es reactivo para un antígeno que contiene CD40 y que no es reactivo para un antígeno que no contiene CD40, mediante un método de selección de hibridomas tal como un ensayo de unión como se describe más abajo. Después, se lleva a cabo la clonación dos veces mediante un método de dilución limitante [en primer lugar, se usa medio HT (medio HAT del que se elimina la aminopterina), y en segundo lugar, se usa el medio normal], y como el hibridoma productor del anticuerpo monoclonal se selecciona un hibridoma que muestra un título de anticuerpo establemente elevado.

(5) Preparación de anticuerpo monoclonal purificado

Las células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal obtenidas mediante el (4) anterior se administran mediante inyección intraperitoneal en ratones o ratones atímicos de 8 a 10 semanas tratados con pristano (se administran intraperitonealmente 0,5 ml de 2,6,10,14-tetrametilpentadecano (pristano), seguido de la alimentación durante 2 semanas. El hibridoma desarrolla tumor ascítico en 10 a 21 días. El fluido ascítico se recoge de los ratones, se centrifuga para eliminar los sólidos, se somete a la eliminación de sales con sulfato de amonio saturado al 40 a 50%, y entonces se hace precipitar mediante ácido caprílico, se hace pasar a través de una columna de DEAE-sefaraosa, una columna de proteína A o una columna de filtración en gel para recoger la fracción de IgG o IgM como un anticuerpo monoclonal purificado.

Además, un hibridoma productor de anticuerpo monoclonal obtenido en el (4) anterior se cultiva en tal medio RPMI1640 que incluye 10% de FBS, y el sobrenadante se elimina mediante centrifugación. Las células precipitadas se suspenden en medio de Hibridoma SFM y se cultivan en 3 a 7 días. La suspensión celular obtenida se centrifuga, y el sobrenadante resultante se hace pasar a través de una columna de proteína A o una columna de proteína G para recoger una fracción de IgG y obtener de ese modo el anticuerpo monoclonal purificado. Además, en el medio de Hibridoma SFM puede haber 5% de DIGO GF21.

La subclase del anticuerpo se puede determinar usando un kit de tipificación de subclase mediante inmunoensayo enzimático. La cantidad de la proteína se puede determinar mediante el método de Lowry o a partir de la absorbancia a 280 nm.

(6) Selección de anticuerpo monoclonal

La selección del anticuerpo monoclonal se lleva a cabo mediante el siguiente ensayo de unión usando el método de inmunoensayo enzimático.

Como el antígeno, se usa una célula con el gen introducido o una proteína recombinante obtenida introduciendo un vector de expresión que comprende un ADNc que codifica CD40 obtenido en el (1) anterior en *Escherichia coli*, levadura, una célula de insecto, una célula de animal, o similar, o un polipéptido purificado o péptido parcial obtenido a partir de un tejido humano. Cuando el antígeno es un péptido parcial, se prepara y se usa un conjugado con BSA, KLH o similar.

Tras obtener estos antígenos en una capa sólida dispensándolos en una placa de 96 pocillos, se dispensa en ella como anticuerpo primario un suero de un animal a inmunizar, un sobrenadante de cultivo de un hibridoma productor de anticuerpo monoclonal, o un anticuerpo purificado, y se deja reaccionar. Después de lavar a conciencia con PBS o PBS-Tween, se dispensa en ella como anticuerpo secundario un anticuerpo anti-inmunoglobulina marcado con biotina, una enzima, un material quimioluminiscente, un compuesto radioactivo, o similar, y se deja reaccionar. Tras lavar a conciencia con PBS-Tween, se lleva a cabo la reacción, dependiendo del marcador del anticuerpo secundario, para seleccionar un anticuerpo monoclonal que reacciona específicamente frente al antígeno.

El anticuerpo que compite con el anticuerpo monoclonal anti-CD40 de la presente invención por su unión a la región extracelular de CD40 se puede preparar añadiendo un anticuerpo a ensayar al sistema de ensayo de unión mencionado anteriormente, y llevando a cabo la reacción. Esto es, un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal así obtenido por su unión a la región extracelular de CD40 se puede preparar llevando a cabo un cribado de un anticuerpo mediante el cual la unión del anticuerpo se inhibe cuando se añade el anticuerpo a ensayar.

Además, un anticuerpo que se une a un epítipo que es el mismo que el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal de la presente invención que reconoce la región extracelular de CD40 se puede obtener identificando el epítipo del anticuerpo obtenido en el ensayo de unión anterior, y preparando un péptido sintético parcial, un péptido sintético que imita la estructura tridimensional del epítipo, o similar, seguido de la inmunización.

En la presente invención, una actividad agonista se puede medir mediante una variedad de ensayos. Por ejemplo, como se muestra en los Ejemplos, se puede ejemplificar un método para medir la promoción de la expresión de CD95 mediante un anticuerpo anti-CD40 usando células Ramos.

2. Preparación de anticuerpo recombinante

Como ejemplos de producción de anticuerpos recombinantes, se muestran más abajo procedimientos para producir un anticuerpo quimérico humano y un anticuerpo con CDR injertadas humano.

(1) Construcción de vector de expresión de anticuerpo recombinante

Un vector de expresión de anticuerpo recombinante es un vector de expresión para célula de animal en el que se han insertado ADN que codifican CH y CL de un anticuerpo humano, y se construye clonando cada uno de los ADN que codifican CH y CL de un anticuerpo humano en un vector de expresión para la célula de animal.

La región C de un anticuerpo humano puede ser CH y CL de cualquier anticuerpo humano. Los ejemplos incluyen CH que pertenece a la subclase γ , CL que pertenece a la clase κ , y similares. Como los ADN que codifican CH y CL de un anticuerpo humano, se puede usar un ADN cromosómico que comprende un exón y un intrón o ADNc. Como el vector de expresión para la célula de animal, se puede usar cualquier vector de expresión, en tanto que se le pueda insertar en él un gen que codifica la región C de un anticuerpo humano y se pueda expresar en él. Los ejemplos incluyen pAGE107 [Cytotechnol., 3, 133 (1990)], pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307(1987)], pHSG274 [Gene, 27,223 (1984)], pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1527 (1981)], pSG1bd2-4 [Cytotechnol., 4, 173 (1990)], pSE1UK1Sed1-3 [Cytotechnol., 13, 79 (1993)] y similares. Los ejemplos de un promotor y potenciador usados para un vector de expresión para célula de animal incluyen un promotor temprano de SV40 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)], una LTR del virus de leucemia de ratón de Moloney [Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960 (1987)], un promotor de la cadena H de inmunoglobulina [Cell, 41, 479 (1985)] y un potenciador [Cell, 33, 717 (1983)], y similares.

Con respecto a la facilidad de construcción de un vector de expresión de anticuerpo recombinante, la facilidad de introducción en células de animales, y el balance entre las cantidades de expresión de las cadenas H y L del anticuerpo en células de animales, como el vector para la expresión de anticuerpo recombinante se usa un tipo en el que ambos genes existen en el mismo vector (tipo tándem) [J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)]. Sin embargo, se puede usar un tipo en el que un gen que codifica una cadena H de anticuerpo y un gen que codifica una cadena L de anticuerpo existen en vectores separados. Los ejemplos del tipo tándem del vector para expresión de anticuerpo recombinante incluyen pKANTEX93 (documento WO 97/10354), pEE18 [Hybridoma, 17, 559 (1998)], y similares.

(2) Obtención de ADNc que codifica la región V de anticuerpo derivado de animal no humano, y análisis de la secuencia de aminoácidos

Los ADNc que codifican VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano se obtienen según lo siguiente.

Se extrae ARNm de células de hibridoma que producen un anticuerpo derivado de un animal no humano para sintetizar ADNc. El ADNc sintetizado se clona en un vector tal como un fago o un plásmido, para separar una genoteca de ADNc. Cada uno de un fago recombinante o plásmido recombinante que comprende ADNc que codifica VH o VL se aísla de la genoteca usando como sonda ADN que codifica una parte de la región C o región V de un anticuerpo derivado de un animal no humano. Se determina la longitud completa de las secuencias nucleotídicas de VH y VL del anticuerpo derivado de un animal no humano de interés en el fago recombinante o plásmido recombinante, y la longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL se deducen a partir de las secuencias nucleotídicas.

El animal no humano puede ser cualquier animal, tal como ratón, rata, hámster o conejo, en tanto que se pueda producir a partir de él una célula de hibridoma.

Ejemplos del método para prepara ARN total a partir de una célula de hibridoma incluyen un método de tiocianato de guanidina-trifluoroacetato de cesio [Methods in Enzymol., 154, 3 (1987)]; un kit tal como RNA easy kit (fabricado por Qiagen); y similares.

Ejemplos del método para preparar ARNm a partir de ARN total incluyen un método de oligo (dT) inmovilizado en columna de celulosa [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]; un kit tal como Oligo-dT30 <Super> mRNA Purification Kit (fabricado por Takara Bio); y similares. Además, el ARNm se puede preparar a partir de una célula de hibridoma usando un kit tal como Fast Track mRNA Isolation Kit (fabricado por Invitrogen), Quick Prep mRNA Purification Kit (fabricado por Pharmacia), y similar.

Los ejemplos del método para sintetizar ADNc y preparar una genoteca de ADNc incluyen métodos conocidos [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989); Current Protocols in Molecular Biology, Suplemento 1, John Wiley & Sons (1987-1997)]; un kit tal como Super Script™ Plasmid System para la síntesis de ADNc y clonación plasmídica (fabricado por Invitrogen), ZAP-cDNA Kit (fabricado por Stratagene); y similares.

El vector en el que se inserta el ADNc sintetizado usando como molde ARNm extraído de una célula de hibridoma

para preparar una genoteca de ADNc puede ser cualquier vector, en tanto que se pueda insertar el ADNc. Los ejemplos incluyen ZAP Express [Strategies, 5, 58 (1992)], pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)], λzapII (fabricado por Stratagene), λgt10 y λgt11 [DNA Cloning: A Practical Approach, I, 49 (1985)], Lambda BlueMid (fabricado por Clontech), λExCell y pT7T3-18U (fabricado por Pharmacia), pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)], pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)], y similares.

Se puede usar cualquier *Escherichia coli* para introducir la genoteca de ADNc construida mediante un vector fágico o plasmídico, en tanto que la genoteca de ADNc se pueda introducir, expresar y mantener. Los ejemplos incluyen XL1-Blue MRF' [Strategies, 5, 81 (1992)], C600 [Genetics, 39, 440 (1954)], Y1088 e Y1090 [Science, 222: 778 (1983)], NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)], K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)], JM105 [Gene, 38, 275 (1985)], y similares.

Para seleccionar clones de ADNc que codifican VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano a partir de la genoteca de ADNc, se puede usar un método de hibridación en colonias o de hibridación en placas que usa una sonda marcada isotópicamente o fluorescentemente [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)].

También, los ADNc que codifican VH y VL se pueden preparar a través de la reacción en cadena de polimerasa (en adelante denominada en la presente memoria como "PCR"; Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Current Protocols in Molecular Biology, Suplemento 1, John Wiley & Sons (1987-1997)) preparando cebadores y usando como molde ADNc preparado a partir de ARNm o una genoteca de ADNc.

La secuencia nucleotídica del ADNc se puede determinar digiriendo el ADNc seleccionado mediante el método anterior con enzimas de restricción apropiadas y similares, clonando los fragmentos en un plásmido tal como pBluescript SK(-) (fabricado por Stratagene), llevando a cabo la reacción mediante un método de análisis de nucleótidos usado habitualmente, tal como el método didesoxi de Sanger, F. et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)], y analizando entonces la secuencia usando un analizador de secuencias nucleotídicas automático, tal como el secuenciador de ADN A.L.F. (fabricado por Pharmacia).

Tanto si los ADNc obtenidos codifican o no las secuencias de aminoácidos completas de VH y VL del anticuerpo que contiene una secuencia señal secretora se puede confirmar estimando la longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL a partir de la secuencia nucleotídica determinada y comparándola con la longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL de anticuerpos conocidos [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)]. La longitud de la secuencia señal secretora y de la secuencia de aminoácidos N-terminal se puede deducir comparando la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo que comprende una secuencia señal secretora con la longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL de anticuerpos conocidos [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)], y también se puede saber el subgrupo al que pertenecen. Además, la secuencia de aminoácidos de cada una de las CDR de VH y VL se puede encontrar comparando las secuencias de aminoácidos obtenidas con secuencias de aminoácidos de VH y VL de anticuerpos conocidos [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)].

Además, la novedad de la secuencia se puede examinar llevando a cabo una búsqueda de homología con secuencias en cualquier base de datos, por ejemplo SWISS-PROT, PIR-Protein o similar, usando la longitud completa obtenida de las secuencias de aminoácidos de VH y VL, por ejemplo según el método de BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] o similar.

(3) Construcción de vector para expresión de anticuerpo quimérico humano

Los ADNc que codifican VH y VL de anticuerpo de animal no humano se clonan en la dirección 5' de genes que codifican CH o CL de anticuerpo humano de vector para expresión de anticuerpo recombinante obtenido en el (1) anterior, para construir de ese modo un vector para la expresión de anticuerpo quimérico humano.

Por ejemplo, cada ADNc que codifica VH y VL de anticuerpo de animal no humano se liga a ADN sintético que comprende una secuencia nucleotídica 3' terminal de VH o VL de anticuerpo de animal no humano y una secuencia nucleotídica 5' terminal de CH o CL de anticuerpo humano y que tiene una secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción apropiada en ambos extremos, y se clona de manera que cada uno de ellos se expresa en una forma apropiada en la dirección 5' del gen que codifica CH o CL de anticuerpo humano del vector para expresión de anticuerpo con CDR injertadas humano obtenido en el (1) anterior para construir un vector para la expresión de anticuerpo quimérico humano.

Además, el ADNc que codifica VH o VL del anticuerpo derivado de un animal no humano se amplifica mediante PCR usando un ADN sintético que tiene una secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción apropiada en ambos terminales, y cada uno de ellos se clona al vector para expresión de anticuerpo recombinante obtenido en el (1) anterior.

(4) Construcción de ADNc que codifica la región V de anticuerpo con CDR injertadas humano

Los ADNc que codifican VH o VL de un anticuerpo con CDR injertadas humano se pueden obtener según lo siguiente. En primer lugar, se seleccionan secuencias de aminoácidos de FR en VH o VL de un anticuerpo humano al que se transplantan secuencias de aminoácidos de las CDR en VH o VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano. Como secuencia de aminoácidos de FR a seleccionar, se pueden usar cualesquiera secuencias de aminoácidos, en tanto que procedan de ser humano. Los ejemplos incluyen secuencias de aminoácidos de FRs en VH o VL de anticuerpos humanos registradas en la base de datos tal como Protein Data Bank o similar, y secuencias de aminoácidos comunes a subgrupos de FRs en VH o VL de anticuerpos humanos [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)], y similares. A fin de inhibir la disminución en la actividad de unión del anticuerpo, se seleccionan secuencias de aminoácidos de FR que tienen homología elevada (al menos 60% o más) con la secuencia de aminoácidos de FR en VH o VL del anticuerpo original.

Después, las secuencias de aminoácidos de las CDR de VH o VL del anticuerpo original se injertan a la secuencia de aminoácidos seleccionada de FR en VH o VL del anticuerpo humano, respectivamente, para diseñar cada secuencia de aminoácidos de VH o VL de un anticuerpo con CDR injertadas humano. Las secuencias de aminoácidos diseñadas se convierten en secuencias de ADN considerando la frecuencia del uso de codones encontrada en secuencias nucleotídicas de genes de anticuerpos [Sequence of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)], y se diseña respectivamente la secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de VH o VL de un anticuerpo con CDR injertadas humano.

En base a las secuencias nucleotídicas diseñadas, se sintetizan varios ADN sintéticos que tienen una longitud de alrededor de 100 nucleótidos, y se lleva a cabo la PCR usándolos. En este caso, se prefiere en cada una de la cadena H y la cadena L que se diseñen 6 ADN sintéticos en vista de la eficiencia de reacción de PCR y las longitudes de los ADN que se pueden sintetizar.

Además, el ADNc que codifica VH o VL de un anticuerpo con CDR injertadas humano se puede clonar fácilmente en el vector para la expresión de anticuerpo con CDR injertadas humano construido en el (1) anterior introduciendo la secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción apropiada en el término 5' de los ADN sintéticos que existen en ambos extremos.

Como alternativa, en base a la secuencia nucleotídica deseada, la clonación de ADNc se puede llevar a cabo usando cada una de la cadena H sintetizada como un ADN y la cadena L de longitud completa de ADN sintético.

Tras la PCR, un producto amplificado se clona en un plásmido, tal como pBluescript SK (-) (fabricado por Stratagene) o similar, y la secuencia nucleotídica se determina según un método similar al método descrito en el (2) anterior para obtener un plásmido que tiene una secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de VH o VL de un anticuerpo con CDR injertadas humano deseado.

(5) Modificación de la secuencia de aminoácidos de la región V del anticuerpo con CDR injertadas humano

Se sabe que cuando un anticuerpo con CDR injertadas humano se produce injertando simplemente solo las CDR en VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano en FRs de VH y VL de un anticuerpo humano, su actividad de unión al antígeno es menor que la del anticuerpo original derivado de un animal no humano [BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991)]. En anticuerpos con CDR injertadas humano, entre las secuencias de aminoácidos de FRs en VH y VL de un anticuerpo humano, un resto de aminoácido que está relacionado directamente con la unión a un antígeno, o un resto de aminoácido que está relacionado indirectamente con la unión a un antígeno mediante la interacción con un resto de aminoácido en CDR o mediante el mantenimiento de la estructura tridimensional de un anticuerpo, se identifica y modifica a un resto de aminoácido que se encuentra en el anticuerpo no humano original para incrementar de ese modo la actividad de unión al antígeno que se ha disminuido.

A fin de identificar los restos de aminoácidos relacionados con la actividad de unión al antígeno en FR, se construye la estructura tridimensional de un anticuerpo y se analiza mediante cristalografía de rayos X [J. Mol. Biol., 112, 535 (1977)], modelo por ordenador [Protein Engineering, 7, 1501 (1994)], o similar. Además, el anticuerpo con CDR injertadas humano modificado que tiene una actividad de unión al antígeno requerida se puede obtener a través de diversos intentos que producen varios anticuerpos modificados de cada anticuerpo, y se examina la correlación entre cada uno de los anticuerpos modificados y su actividad de unión al anticuerpo, y a través de un procedimiento de ensayo y error.

La modificación de la secuencia de aminoácidos de FR en VH y VL de un anticuerpo humano se puede lograr usando diversos ADN sintéticos para la modificación según PCR, como se describe en el (4) anterior. Con respecto al producto amplificado obtenido mediante la PCR, la secuencia nucleotídica se determina según el método como se describe en el (2) anterior, de manera que se confirma si la modificación objetiva se ha llevado a cabo o no.

(6) Construcción de vector para expresión de anticuerpo con CDR injertadas humano

Un vector para la expresión de anticuerpo con CDR injertadas humano se puede construir clonando cada ADNc que codifica VH o VL de un anticuerpo recombinante construido en dirección 5' de cada gen que codifica CH o CL del anticuerpo humano en el vector para la expresión de anticuerpo con CDR injertadas humano obtenido en el (1) anterior.

Por ejemplo, cuando se introducen secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción apropiadas al término 5' de ADN sintéticos situados en ambos extremos entre los ADN sintéticos usados en la construcción de VH o VL del anticuerpo con CDR injertadas humano obtenido en el (4) y (5) anteriores, la clonación se puede llevar a cabo de manera que se expresen en una forma apropiada en la dirección 5' de cada gen que codifica CH o CL del anticuerpo humano en el vector para la expresión de anticuerpo con CDR injertadas humano obtenido en el (1) anterior.

(7) Expresión transitoria de anticuerpo recombinante

A fin de evaluar eficientemente la actividad de unión al antígeno de diversos anticuerpos con CDR injertadas humanos producidos, los anticuerpos recombinantes se pueden expresar transitoriamente usando el vector para la expresión de anticuerpo con CDR injertadas humano obtenido en el (3) y (6) anterior, o su vector de expresión modificado.

Como célula hospedante se puede usar cualquier célula, en tanto que la célula hospedante pueda expresar un anticuerpo recombinante. Generalmente, se usa la célula COS-7 (ATCC CRL1651) [Methods in Nucleic Acids Res., CRC Press, 283 (1991)].

Los ejemplos del método para introducir el vector de expresión en la célula COS-7 incluyen un método de DEAE-dextrano [Methods in Nucleic Acids Res., CRC Press, 283 (1991)], un método de lipofección [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)], y similares.

Tras la introducción del vector de expresión, la cantidad de expresión y la actividad de unión al antígeno del anticuerpo recombinante en el sobrenadante del cultivo se pueden determinar mediante el ensayo inmunsorbente ligado a enzima [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Tercera edición, Academic Press (1996), Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Monoclonal Antibody Experiment Manual, Kodansha Scientific (1987)] y similar.

(8) Obtención de un transformante que expresa de forma estable un anticuerpo recombinante, y preparación del anticuerpo recombinante

Un transformante que expresa de forma estable un anticuerpo recombinante se puede obtener introduciendo en una célula hospedante apropiada el vector para la expresión del anticuerpo recombinante obtenido en los (3) y (6) anteriores.

Los ejemplos del método para introducir el vector de expresión en una célula hospedante incluyen electroporación [Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 257891/90, Cytotechnology, 3, 133 (1990)] y similares.

Como célula hospedante en la que se introduce un vector para la expresión de anticuerpo recombinante, se puede usar cualquier célula, en tanto que sea una célula hospedante que pueda producir al anticuerpo recombinante. Los ejemplos incluyen CHO-K1 (ATCC CCL-61), DUKXB11 (ATCC CCL-9096), Pro-5 (ATCC CCL-1781), CHO-S (nº de catálogo de Life Technologies, 11619), célula de mieloma de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (en adelante aquí, también denominada como YB2/0), célula de mieloma de ratón NSO, célula de mieloma de ratón SP2/0-Ag14 (ATCC CRL1581), célula P3X63-AG8.653 de ratón (ATCC CRL1580), célula CHO en la que un gen de dihidrofolato reductasa (en adelante denominado en la presente memoria como "dhfr") es defectuoso [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, 4216 (1980)], Lec13 con resistencia adquirida a lectina [Somatic Cell and Molecular genetics, 12, 55 (1986)], célula CHO en la que el gen de α 1,6-fucosiltransferasa es defectuoso (documento WO 05/35586), célula YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 de rata (ATCC CRL1662), y similares.

Tras introducir el vector de expresión, los transformantes que expresan de forma estable un anticuerpo recombinante se seleccionan cultivando en un medio para cultivo de células de animal que contiene un agente tal como sulfato de G418 (en adelante denominado en la presente memoria como "G418") o similar (Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 257891/90).

Los ejemplos del medio para el cultivo de células de animal incluyen medio RPMI1640 (fabricado por Invitrogen), medio GIT (fabricado por Nissui Pharmaceutical), medio EX-CELL301 (fabricado por JRH), medio IMDM (fabricado por Invitrogen), medio de hibridoma-SFM (fabricado por Invitrogen), medios obtenidos añadiendo diversos aditivos tales como FBS a estos medios, y similares. El anticuerpo recombinante se puede producir y acumular en un sobrenadante de cultivo cultivando en un medio los transformantes seleccionados. La cantidad de expresión y la actividad de unión al antígeno del anticuerpo recombinante en el sobrenadante del cultivo se pueden medir mediante

ELISA o similar. También, en el transformante, la cantidad de expresión del anticuerpo recombinante se puede incrementar usando el sistema de amplificación de DHFR o similar, según el método descrito en la Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 257891/90.

5 3. Purificación de anticuerpo monoclonal

El anticuerpo recombinante se puede purificar del sobrenadante del cultivo del transformante usando una columna de proteína A [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Tercera edición, Academic Press (1996), Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]. Se puede usar cualquier otro método convencional para la purificación de proteínas.

El peso molecular de la cadena H o de la cadena L del anticuerpo recombinante purificado o de la molécula de anticuerpo como un todo se determina mediante electroforesis en gel de poliacrilamida [Nature, 227, 680 (1970)], transferencia Western [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Tercera edición, Academic Press (1996), Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)], y similar.

4. Evaluación de la actividad del anticuerpo purificado

La actividad del anticuerpo purificado de la presente invención se puede evaluar de la siguiente manera.

La actividad de unión a una célula que expresa CD40 se evalúa mediante el ensayo de unión descrito en el 1-(6) anterior, o mediante un método de resonancia de plasmones superficiales usando un sistema tal como BIACore. Además, se puede medir mediante una técnica de anticuerpo fluorescente [Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)] o similar.

Además, la actividad de CDC o la actividad de ADCC frente a una estirpe celular positiva para el antígeno se evalúa mediante un método conocido [Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)].

En la presente invención, una actividad agonista se puede medir mediante una variedad de ensayos. Por ejemplo, como se ilustra en los Ejemplos que seguirán, se puede ejemplificar un método que mide la promoción de la expresión de CD95 mediante un anticuerpo anti-CD40 usando células Ramos.

4. Método para controlar la actividad efectora del anticuerpo

Como método para controlar la actividad efectora del anticuerpo monoclonal de la presente invención, se conoce un método para controlar una cantidad de fucosa (en adelante denominada en la presente memoria también como "fucosa central") que se une en enlace α -1,6 a N-acetilglucosamina (GlcNAc) presente en un extremo reductor de una cadena de azúcar enlazada mediante N de tipo complejo que está unida a asparagina (Asn) en la posición 297 de una región Fc de un anticuerpo (documentos WO2005/035586, WO2002/31140, y WO00/61739), un método para controlar la actividad efectora de un anticuerpo monoclonal modificando un grupo o grupos de aminoácidos de una región Fc del anticuerpo, y similares.

La "actividad efectora" significa una actividad dependiente del anticuerpo que se produce a través de una región Fc de un anticuerpo. Como actividad efectora, se conocen la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (actividad de ADCC), citotoxicidad dependiente del complemento (actividad de CDC), fagocitosis dependiente de anticuerpo (actividad de ADP) por células fagocíticas tales como macrófagos o células dendríticas, y similar.

Controlando el contenido de fucosa central de una cadena de azúcar enlazada mediante N de tipo complejo de Fc de un anticuerpo, se puede incrementar o disminuir la actividad efectora del anticuerpo. Según un método de reducción del contenido de fucosa que está unida a una cadena de azúcar enlazada mediante N de tipo complejo unida a Fc del anticuerpo, un anticuerpo al que no está unida fucosa se puede obtener mediante la expresión de un anticuerpo usando una célula CHO que es deficiente en un gen que codifica α 1,6-fucosiltransferasa. El anticuerpo al que no está unida la fucosa tiene una actividad de ADCC elevada. Por otro lado, según un método para incrementar un contenido de fucosa que está unida a una cadena de azúcar enlazada mediante N de tipo complejo enlazada a Fc de un anticuerpo, un anticuerpo al que está unida la fucosa se puede obtener mediante la expresión de un anticuerpo usando una célula hospedante en la que se introduce un gen que codifica α 1,6-fucosiltransferasa. El anticuerpo al que está unida la fucosa tiene una actividad de ADCC menor que el anticuerpo al que no está unida la fucosa.

Adicionalmente, modificando el resto o restos de aminoácidos de una región Fc de un anticuerpo, la actividad de ADCC o la actividad de CDC se puede incrementar o disminuir. Debido a que se sabe que una actividad de ADCC o de CDC es variable según una subclase de un anticuerpo, se considera que la actividad de ADCC o de CDC se puede disminuir mediante la mutación de una subclase del anticuerpo. Por ejemplo, generalmente entre las subclases de IgG humana, IgG4 es conocida como una subclase que tiene actividades de ADCC y de CDC bajas, IgG2 tiene una actividad de CDC pero con una actividad de ADCC baja, y se ha dado a conocer que IgG1 tiene actividades tanto de ADCC como de CDC elevadas (Charles A. Janeway et al., Immunobiology, 1997, Current

Biology Ltd/Garland Publishing Inc.). Aprovechando estas características, se puede obtener un anticuerpo con menos citotoxicidad celular seleccionando una subclase particular. Además, un anticuerpo que tenga una actividad deseada se puede preparar mediante una combinación de una subclase particular de un anticuerpo con mutaciones de punto. Además, un anticuerpo que tiene una actividad deseada se puede preparar combinando un anticuerpo que comprende una subclase específica y una mutación de punto.

Además de las sustituciones anteriores, tales como (i) la sustitución de V234A y G237A (las cifras se basan en el índice EU como en Kabat et al.) en la subclase IgG2 (Michael, S., et al., J. Immunol., 1997, 159: 3613) y (ii) la sustitución de D270, K322, P329, o P331 por A o la sustitución de P331 por S o G (Esohe E. Idusogie et al. J. Biol. Chem. 1994, 269:3469-3474, Yuanyuan Xu et al. J. Biol. Chem. 1994, 269: 3469-3474; Brekke, O.H. et al. Eur. J. Immunol. 1994, 24: 2542; Morgan, A., et al., Immunology 1995, 86: 319; Lund, J., et al., J. Immunol., 1996, 157: 4963; y Tao, M. H., et al., J. Exp. Med. 1993, 178: 661), se pueden citar los siguientes ejemplos.

Se piensa que Glu233-Ser239, Gly316-Lys338, Lys274-Arg301, Tyr407-Arg416, Asn297, Glu318, Leu234-Ser239, Asp265-Glu269, Asn297-Thr299, y Ala327-Ile332 están implicados en la unión entre IgG y FcR (Duncan, A. R., Woof, J. M., Partridge, L. J., Burton, D. R., y Winter, G (1988) Nature 332, 563-564; Gessner, J. E., Heiken, H., Tamm, A., y Schmidt, R. E. (1998) Ann. Hematol. 76, 231-248; Gavin, A., Hulett, M., y Hogarth, P. M. (1998) en The Immunoglobulin Receptors and Their Physiological and Pathological Roles in Immunity (van de Winkel, J. G. J., y Hogarth, P. M., eds), p. 11-35; Kluwer Academic Publishers Group, Dordrecht, Países Bajos, Sautes, C. (1997) en Cell-mediated Effects of Immunoglobulins (Fridman, W. H., y Sautes, C., eds), p. 29-66; R. G. Landes Co., Austin, TX, Da'ron, M. (1997) Annu. Rev. Immunol. 15, 203-234; Canfield, S. M., y Morrison, S. L. (1991) J. Exp. Med. 173,1483-1491; Chappel, M. S., Isenman, D. E., Everett, M., Xu, Y.-Y., Dorrington, K. J., y Klein, M. H. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 9036-9040; Woof, J. M., Partridge, L. J., Jefferis, R., y Burton, D. R. (1986) Mol. Immunol. 23, 319-330; y Wines, B. D., Powell, M. S., Parren, P. W. H. I., Barnes, N., y Hogarth, P. M. (2000) J. Immunol. 164, 5313-5318). Introduciendo una mutación en tales regiones, se puede reducir la actividad de ADCC. Específicamente, la capacidad de unión a FcR se puede reducir sustituyendo L235 por E y A, respectivamente.

Como alternativa, un anticuerpo en el que se controla la actividad efectora del anticuerpo se puede obtener usando en un anticuerpo una combinación de las mutaciones de punto mencionadas anteriormente.

Puesto que un anticuerpo anti-CD40 que tiene actividad agonista tiene la capacidad para activar el sistema inmune y por lo tanto se puede usar en un agente terapéutico para una variedad de enfermedades, se considera que es preferible que el anticuerpo no tenga o tenga actividad de ADCC y de CDC disminuida que conduzca a muerte celular de células que expresan CD40 debido a la activación. Si las células que expresan CD40 están dañadas por una actividad de ADCC o una actividad de CDC, se considera que existe la posibilidad de un estado de supresión inmune contrario a la activación inmune esperada, y la posibilidad de provocar un empeoramiento de la enfermedad (Charles A. Janeway et al., Immunology, 1997, Current Biology Ltd./Garland Publishing Inc.). Usando esta característica para seleccionar un anticuerpo que comprende una subclase específica, se puede preparar un anticuerpo que tenga una citotoxicidad reducida.

5. Método para tratar las enfermedades usando el anticuerpo anti-CD40 de la presente invención

El anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede usar para tratar tumor maligno o infección.

El agente terapéutico que comprende el anticuerpo monoclonal de la presente invención puede ser solamente el anticuerpo como principio activo, y se suministra preferiblemente como una preparación farmacéutica producida mediante un método apropiado bien conocido en el campo técnico de farmacia, mezclándolo con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

Se prefiere seleccionar una vía de administración que sea la más eficaz en el tratamiento. Los ejemplos incluyen la administración oral y la administración parenteral, tal como la administración bucal, traqueal, rectal, subcutánea, intramuscular o intravenosa. En el caso de una formulación de anticuerpo o peptídica, se prefiere la administración intravenosa. La forma de dosificación incluye pulverizaciones, cápsulas, comprimidos, gránulos, jarabes, emulsiones, supositorios, inyecciones, ungüentos, cintas y similares.

La preparación farmacéutica adecuada para administración oral incluye emulsiones, jarabes, cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos y similares.

Las preparaciones líquidas tales como emulsiones y jarabes se pueden producir usando, como aditivos, agua; azúcares tales como sacarosa, sorbitol y fructosa; glicoles tales como polietilenglicol y propilenglicol; aceites tales como aceite de sésamo, aceite de oliva y aceite de haba de soja; antisépticos tales como ésteres de ácido p-hidroxibenzoico; sabores tales como sabor de fresa y menta piperita; y similares.

Las cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos, y similares se pueden producir usando, como aditivos, excipientes tales como lactosa, glucosa, sacarosa y manitol; agentes disgregantes tales como almidón y alginato sódico; lubricantes tales como estearato de magnesio y talco; aglutinantes tales como alcohol polivinílico,

hidroxipropilcelulosa y gelatina; tensioactivos tales como éster de ácido graso; plastificantes tales como glicerina; y similares.

5 La preparación farmacéutica adecuada para administración parenteral incluye inyecciones, supositorios, pulverizaciones y similares.

Las inyecciones se pueden preparar usando un vehículo tal como una disolución acuosa, una disolución de glucosa, o una mezcla de ambos.

10 Los supositorios se pueden preparar usando un vehículo tal como manteca de cacao, grasa hidrogenada o ácido carboxílico.

15 Las pulverizaciones se pueden preparar usando el anticuerpo o fragmento de anticuerpo como tal, o usándolo junto con un vehículo que no estimule la membrana mucosa bucal o de las vías respiratorias del paciente y que pueda facilitar la absorción del compuesto dispersándolo como partículas finas. El vehículo incluye lactosa, glicerol, y similar. Dependiendo de las propiedades del anticuerpo y del vehículo, es posible producir preparaciones farmacéuticas tales como aerosoles y formulaciones en polvo.

20 Además, los componentes ejemplificados como aditivos para preparaciones orales también se pueden añadir a las preparaciones parenterales.

5. Método para diagnosticar la enfermedad usando el anticuerpo anti-CD40 del presente anticuerpo monoclonal

25 Una enfermedad relacionada con CD40 se puede diagnosticar detectando o midiendo CD40 o una célula que expresa CD40, usando el anticuerpo monoclonal de la presente invención.

30 Un diagnóstico del cáncer, una de las enfermedades relacionadas con CD40, se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante la detección o medida de CD40 como sigue.

El diagnóstico se puede realizar detectando CD40 que se expresa en células cancerosas en un cuerpo de un paciente usando un método inmunológico tal como citometría de flujo.

35 Un método inmunológico es un método en el que una cantidad de anticuerpo o una cantidad de antígeno se detecta o determina usando un antígeno o anticuerpo marcado. Los ejemplos del método inmunológico incluyen un método con inmunoanticuerpo marcado con sustancia radioactiva, inmunoensayo enzimático, inmunoensayo fluorescente, inmunoensayo luminiscente, método de transferencia Western, medios fisicoquímicos, y similares.

40 Como método para la detección o determinación de la cantidad de CD40 en la presente invención, se puede incluir cualquier método conocido. Por ejemplo, se puede ejemplificar un método de detección inmunológico o un inmunoensayo.

45 Los ejemplos del método con inmunoanticuerpos marcados con sustancias radioactivas incluyen un método en el que el anticuerpo de la presente invención se deja reaccionar con un antígeno o una célula que expresa un antígeno, entonces el anticuerpo anti-inmunoglobulina sometido a marcaje radioactivo, o un fragmento de unión del mismo, se deja reaccionar con aquél, seguido de la determinación usando un contador de centelleo o similar.

50 Los ejemplos del inmunoensayo enzimático incluyen un método en el que el anticuerpo de la presente invención se deja reaccionar con un antígeno o una célula que expresa un antígeno, después un anticuerpo anti-inmunoglobulina, o un fragmento de unión del mismo, sometido a marcaje de anticuerpo se deja reaccionar con aquél, y el pigmento coloreado se mide mediante un espectrofotómetro, y, por ejemplo, se puede usar un ELISA de sándwich. Como marcador usado en el inmunoensayo enzimático, se puede usar cualquier marcador enzimático conocido [Enzyme Immunoassay, publicado por Igaku Shoin (1987)] como ya se describió. Los ejemplos incluyen marcaje con fosfatasa alcalina, marcaje con peroxidasa, marcaje con luciferasa, marcaje con biotina, y similares.

55 El ELISA de sándwich es un método en el que un anticuerpo se une a una fase sólida, se atrapa un antígeno a detectar o medir, y se permite que otro anticuerpo reaccione con el antígeno atrapado. En el ELISA, se preparan 2 tipos de anticuerpo que reconoce al antígeno a detectar o medir, o el fragmento de anticuerpo del mismo en el que el sitio de reconocimiento del antígeno es diferente, y un anticuerpo o fragmentos de anticuerpo se adsorben previamente en una placa (tal como una placa de 96 pocillos) y otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo se marca con una sustancia fluorescente tal como FITC, una enzima tal como peroxidasa, o biotina. La placa a la que se adsorbe el anticuerpo anterior se deja reaccionar con la célula separada del organismo vivo o la suspensión celular destruida de la misma, tejido o disolución desintegrada del mismo, células cultivadas, suero, efusión pleural, ascitis, disolución ocular o similar, entonces se deja reaccionar con el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo monoclonal marcado y se lleva a cabo la reacción de detección correspondiente a la sustancia marcada. Cuando la concentración de antígeno en la muestra a ensayar se mide mediante el método, la concentración de antígeno en la

muestra a ensayar se puede calcular a partir de una curva de calibración preparada mediante dilución por etapas de antígeno de concentración conocida. Como anticuerpo usado para ELISA de sándwich, se puede usar cualquier anticuerpo policlonal y anticuerpo monoclonal, o se pueden usar fragmentos de anticuerpo tales como Fab, Fab' y F(ab)₂. Como combinación de dos tipos de anticuerpos usados en ELISA de sándwich, se puede usar una combinación de anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpo que reconocen diferentes epítomos, o se puede usar una combinación de anticuerpo policlonal con anticuerpo monoclonal o fragmentos de anticuerpo.

Un inmunoensayo fluorescente incluye un método descrito en las bibliografías [Monoclonal Antibodies - Principles and practice, Tercera Edición, Academic Press (1996); Manual for Monoclonal Antibody Experiments, Kodansha Scientific (1987)] y similar. Como marcador para el ensayo fluorescente, se puede usar cualquiera de los marcadores fluorescentes conocidos (Fluorescent Immunoassay, Soft Science, (1983)) ya descritos. Los ejemplos incluyen FITC, RITC, y similares.

El inmunoensayo luminiscente se puede llevar a cabo usando los métodos descritos en la bibliografía [Bioluminescence and Chemical Luminescence, Rinsho Kensa, 42, Hirokawa Shoten (1998)] y similares. Como marcador usado para el inmunoensayo luminiscente, se puede incluir cualquiera de los marcadores luminiscentes conocidos. Los ejemplos incluyen éster de acridinio, lofina o similar.

La transferencia Western es un método en el que un antígeno o una célula que expresa un antígeno se fracciona mediante electroforesis en SDS-gel de poliacrilamida [Antibodies-A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)], el gel se transfiere sobre una membrana de PVDF o sobre una membrana de nitrocelulosa, la membrana se deja reaccionar con anticuerpo o fragmento de anticuerpo que reconoce al antígeno, después se deja reaccionar con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-IgG de ratón que está marcado con una sustancia fluorescente tal como FITC, un marcador enzimático tal como peroxidasa, un marcador de biotina, o similar, y el marcador se visualiza para confirmar la reacción. Más abajo se describe un ejemplo de transferencia Western.

Las células o tejidos en los que se expresa CD40 se disuelven en una disolución y, en condiciones reductoras, se someten a electroforesis mediante un método de SDS-PAGE 0,1 a 30 µg como una cantidad de proteína por línea. La proteína sometida a electroforesis se transfiere a una membrana de PVDF y se deja reaccionar con PBS que contiene 1 a 10% de BSA (en adelante denominado en la presente memoria como "BSA-PBS") a temperatura ambiente durante 30 minutos para el bloqueo. Aquí, el anticuerpo monoclonal de la presente invención se deja reaccionar con aquél, se lava con PBS que contiene 0,05 a 0,1% de Tween 20 (en adelante denominado en la presente memoria como "Tween-PBS"), y se deja reaccionar con anticuerpo anti-IgG de ratón de cabra marcado con peroxidasa, a temperatura ambiente durante 2 horas. Se lava con Tween-PBS y se detecta una banda a la que está unido el anticuerpo monoclonal usando ECL™ Western Blotting Detection Reagents (fabricado por Amersham) o similar, para detectar de ese modo CD40. Como anticuerpo usado para la detección en la transferencia Western, se usa un anticuerpo que puede unirse a un polipéptido que no tiene estructura tridimensional de tipo natural.

El método fisicoquímico se lleva a cabo específicamente usando el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención haciendo reaccionar CD40 como un antígeno con el anticuerpo de la presente invención para formar un agregado, y detectando este agregado. Otros ejemplos de los métodos fisicoquímicos incluyen un método capilar, un método de inmunodifusión unidimensional, una inmunoturbidimetría y una inmunoturbidimetría potenciada por látex [Handbook of Clinical Test Methods, Kanehara Shuppan, 499 (1988)].

Por ejemplo, en un método de inmunodifusión por látex, se puede usar un portador tal como látex de poliestireno que tiene un tamaño de partículas de alrededor de 0,1 a 1 µm sensibilizado con anticuerpo o antígeno, y cuando se lleva a cabo una reacción de antígeno-anticuerpo usando el antígeno o anticuerpo correspondiente, la luz dispersada en la disolución de la reacción aumenta mientras que disminuye la luz transmitida. Cuando tal cambio se detecta como absorbancia o turbidez de esfera integral, ahora es posible medir la concentración de antígeno, etc., en la muestra a ensayar.

Para la detección de la célula que expresa CD40, se pueden usar métodos de detección inmunológicos, y preferiblemente se usa un método de inmunoprecipitación, un método de tinción celular fluorescente, un método de tinción tisular inmune, y similar.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito anteriormente de la presente invención está en fase sólida en una placa de 96 pocillos para ELISA, y después se bloquea con BSA-PBS. Cuando el anticuerpo está en un estado no purificado, tal como un sobrenadante de cultivo de célula de hibridoma, la inmunoglobulina antirratón o inmunoglobulina de rata o proteína A o G o similar se adsorbe previamente en una placa de 96 pocillos para ELISA y se bloquea con BSA-PBS, y se le dispensa un sobrenadante de cultivo de célula de hibridoma para la unión. Después de que se desecha BSA-PBS y el residuo se lava suficientemente con PBS, la reacción se lleva a cabo con una disolución disuelta de células o tejidos que expresan CD40. Se extrae un precipitado inmune de la placa bien lavada con un tampón de muestra para SDS-PAGE, y se detecta mediante la transferencia Western descrita anteriormente.

Un método de tinción celular inmune y un método de tinción tisular inmune son métodos de tinción

- inmunofluorescentes (una citometría de flujo) en los que las células o tejidos en los que se expresa el antígeno se tratan, si es necesario, con un tensioactivo o metanol para hacer que un anticuerpo permee fácilmente a las células o tejidos, después el anticuerpo de la presente invención se deja reaccionar con ello, después se deja reaccionar adicionalmente con un anticuerpo anti-inmunoglobulina o fragmento de unión del mismo sometido a marcaje fluorescente tal como FITC, marcaje enzimático tal como peroxidasa o marcaje con biotina, y el marcador se visualiza y se observa bajo un microscopio, o las células se dejan reaccionar con un anticuerpo marcado fluorescentemente y se analizan mediante un citómetro de flujo. Esto se puede llevar a cabo mediante los métodos descritos, por ejemplo, en las bibliografías [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Tercera Edición, Academic Press (1996), Manual for Experiments of Monoclonal Antibodies, Kodansha Scientific (1987)].
- Particularmente, puesto que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención se une a la estructura tridimensional de una región extracelular de CD40, preferiblemente se puede usar para la detección mediante una citometría de flujo de una célula que expresa el polipéptido que mantiene una estructura tridimensional de tipo natural.
- Además, usando el sistema FMAT8100HTS (fabricado por Applied Biosystems) que utiliza el principio de la tinción de anticuerpo fluorescente, la cantidad de antígeno o cantidad de anticuerpo se puede medir sin separar el complejo de anticuerpo-antígeno formado ni el anticuerpo o antígeno libre que no está implicado en la formación del complejo de anticuerpo-antígeno.
- A continuación se describen ejemplos específicos (la región señal se estima mediante SignalPver.3. Además, la región de CDR se decide según la regla de Kabat et al.).

1. Anticuerpo IgG2-AAS (341)

- (1) Secuencia de ADN de cadena pesada (SEC ID NO: 1)

```

ATGTCTGTCT CCTTCCTCAT CTTCCCTGCC GTGCTGGGCC TCCCATGGGG
TGTCCTGTCA CAGGTCCAAC TGCAGCAGTC AGGTCCAGGA CTGGTGAAGC
CCTCGCAGAC CCTCTCACTC ACCTGTGCCA TCTCCGGGGA CAGTGTCTCT
AGCAACAGTG CTACTTGGAA CTGGATCAGG CAGTCCCCAT CGAGAGACCT
TGAGTGGCTG GGAAGGACAT ACTACAGGTC CAAGTGGTAT CGTGATTATG
TAGGATCTGT GAAAAGTCGA ATAATCATCA ACCCAGACAC ATCCAACAAC
CAGTTCTCCC TGCAGCTGAA CTCTGTGACT CCCGAGGACA CGGCTATATA
TTACTGTACA AGAGCACAGT GGCTGGGAGG GGATTACCCC TACTACTACA
GTATGGACGT CTGGGGCCAA GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCAGCTAGC
ACCAAGGGCC CATCGGTCTT CCCCCTGGCG CCCTGCTCCA GGAGCACCTC
CGAGAGCACA GCGGCCCTGG GCTGCCTGGT CAAGGACTAC TTCCCCGAAC
CGGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCTC TGACCAGCGG CGTGCACACC

```

ES 2 561 081 T3

TTCCCAGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC TACTCCCTCA GCAGCGTGGT
 GACCGTGCCC TCCAGCAACT TCGGCACCCA GACCTACACC TGCAACGTAG
 ATCACAAGCC CAGCAACACC AAGGTGGACA AGACAGTTGA GCGCAAATGT
 TGTGTCGAGT GCCCACCCTG CCCAGCACCA CCTGCAGCAG CACCGTCAGT
 CTCCTCTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC
 CTGAGGTCAC GTGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCCAGGTC
 CAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA
 GCCACGGGAG GAGCAGTTCA ACAGCACGTT CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA
 CCGTTGTGCA CCAGGACTGG CTGAACGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC
 TCCAACAAAG GCCTCCCAGC CTCCATCGAG AAAACCATCT CCAAACCAA
 AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA TCCCGGGAGG
 AGATGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAC
 CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA
 CTACAAGACC ACACCTCCCA TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCCTCT
 ACAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC
 TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCACTACA CGCAGAAGAG
 CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA AA

(i) Señal: A en la posición 1 a A en la posición 60

5 (ii) Región variable: C en la posición 61 a A en la posición 444

- CDR1: A en la posición 151 a C en la posición 171
- CDR2: A en la posición 214 a T en la posición 267
- CDR3: G en la posición 364 a C en la posición 411

(iii) Región constante: G en la posición 445 a A en la posición 1422

- 15 • Posición 234 que está indicada por el índice EU como en Kabat et al.: 234 que está indicada por el índice EU como en Kabat et al.: G en la posición 784 a A en la posición 786
- posición 237 que está indicada por el índice EU como en Kabat et al.: G en la posición 790 a A en la posición 792
- 20 • posición 331 que está indicada por el índice EU como en Kabat et al.: T en la posición 1072 a C en la posición 1074

(2) Secuencia de aminoácidos de cadena pesada (SEC ID NO: 2)

25 MSVSFLIFLP VLGLPWGVLS QVQLQQSGPG LVKPSQTLSSL TCAISGDSVS
 SNSATWNWIR QSPSRDLEWL GRTYYRSKWY RDYVGSVKSR I IINPDTSNN
 QFSLQLNSVT PEDTAIYYCT RAQWLGGDYP YYYSMDVWGQ GTTVTVSSAS
 TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSKVHT
 FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVKRC
 CVECPCPAP PAAAPSVELF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV
 QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV
 SNKGLPASIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY
 PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLDSGGS FFLYSKLTVD KSRWQOGNVE
 SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

30 (i) Señal: M en la posición 1 a S en la posición 20

(ii) Región variable: Q en la posición 21 a S en la posición 148

- 5 • CDR1: S en la posición 51 a N en la posición 57
- CDR2: R en la posición 72 a S en la posición 89
- 10 • CDR3: A en la posición 122 a V en la posición 137 (iii) Región constante: A en la posición 149 a A en la posición 474
- posición 234 que está indicada por el índice EU como en Kabat et al.: A en la posición 262
- posición 237 que está indicada por el índice EU como en Kabat et al.: A en la posición 264
- 15 • posición 331 que está indicada por el índice EU como en Kabat et al.: S en la posición 358

(3) Secuencia de ADN de cadena ligera (SEC ID NO:11)

```

ATGGAAGCCC CAGCTCAGCT TCTCTTCCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA
TACCACCGGA GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT
CTCCAGGGGA AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC
AGCTACTTAG CCTGGTACCA ACAGAAACCT GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT
CATCTATGAT GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC AGG TTCAGTG
GCAGTGGGTC TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT
GAAGATTTTG CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACA CTTTCGGCCC
TGGGACCAA GTGGATATCA AACGTACGGT GGCTGCACCA TCTGTCTTCA
TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC CTCTGTTGTG
TGCCTGCTGA ATAACTTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAAGT
GGATAACGCC CTCCAATCGG GTA ACTCCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG
ACAGCAAGGA CAGCACCTAC AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAA
GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC TCGAAGTCA CCCATCAGGG
CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG TGT
    
```

- 20 (i) Señal: A en la posición 1 a A en la posición 60
- (ii) Región variable: G en la posición 61 a A en la posición 372
- 25 • CDR1: A en la posición 130 a C en la posición 162
- CDR2: A en la posición 208 a T en la posición 228
- 30 • CDR3: C en la posición 325 a T en la posición 342 (iii) Región constante: C en la posición 373 a T en la posición 693

(4) Secuencia de aminoácidos de cadena ligera (SEC ID NO: 12)

```

MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS
SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP
EDFAVYYCQQ RSNTFGPGTK VDIKRTVAAP SVFIFPPSDE QLKSGTASVV
CLLNNFYPRE AKVQWKVDNA LQSGNSQESV TEQDSKDSTY SLSSTLTLSK
ADYEKHKVYA CEVTHQGLSS PVTKSFNRGE C*
    
```

- 35 (i) Señal: M en la posición 1 a G en la posición 20
- (ii) Región variable: E en la posición 21 a K en la posición 124
- 40 • CDR1 : R en la posición 44 a A en la posición 54

- CDR2: D en la posición 70 a T en la posición 76
- CDR3: Q en la posición 109 a T en la posición 114

5 (iii) Región constante: R en la posición 125 a C en la posición 231

2. Anticuerpo IgG2-AAS (21.4.1)

(1) Secuencia de ADN de cadena pesada (SEC ID NO: 21)

10

```

ATGGACTGGA CCTGGAGGAT CCTCTTCTTG GTGGCAGCAG CCACAGGAGC
CCACTCCCAG GTGCAGCTGG TGCAGTCTGG GGCTGAGGTG AAGAAGCCTG
GGGCCTCAGT GAAGGTCTCC TGCAAGGCTT CTGGATACAC CTTACCCGGC
TACTATATGC ACTGGGTGCG ACAGGCCCTT GGACAAGGGC TTGAgtGGAT
GGGATGGATC AACCCCTGACA GTGGTGGCAC AAACATATGCA CAGAAGTTTC
AGGGCAGGGT CACCATGACC AGGGACACGT CCATCAGCAC AGCCTACATG
GAGCTGAACA GGCTGAGATC TGACGACACG GCCGTGTATT ACTGTGCGAG
AGATCAGCCC CTAGGATATT GACTAATGG TGTATGCTCC TACTTTGACT
ACTGGGGCCA GGGAAACCTG GTCACCGTCT CCTCAGCTAG CACCAAGGGC
CCATCGGTCT TCCCCCTGGC GCCCTGCTCC AGGAGCACCT CCGAGAGCAC
AGCGGCCCTG GGCTGCCTGG TCAAGGACTA CTTCCCCGAA CCGGTGACGG
TGTCGTGGAA CTCAGGCGCT CTGACCAGCG GCGTGCACAC CTTCCCAGCT
GTCCTACAGT CCTCAGGACT CTACTCCCTC AGCAGCGTGG TGACCGTGCC
CTCCAGCAAC TTCGGCACCC AGACCTACAC CTGCAACGTA GATCACAAGC
CCAGCAACAC CAAGGTGGAC AAGACAGTTG AGCGCAAATG TTGTGTGCGAG
TGCCACCGT GCCCAGCACC ACCTGCAGCA GCACCGTCAG TCTTCCTCTT
CCCCCAAAA CCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
CGTGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCCGAGGT CCAGTTCAAC
TGGTACGTGG ACGGCGTGGG GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCACGGGA
GGAGCAGTTC AACAGCACGT TCCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTTGTGC
ACCAGGACTG GCTGAACGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA
GGCCTCCCAG CCTCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAACCA AAGGGCAGCC
CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA
AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA CCCCAGCGAC
ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC
CACACCTCCC ATGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TACAGCAAGC
TCACCGTGGG CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC
GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT
GTCTCCGGGT AAA
    
```

15 (i) Señal: A en la posición 1 a C en la posición 57

(ii) Región variable: C en la posición 58 a A en la posición 435

20 (iii) Región constante: G en la posición 436 a A en la posición 1413

- posición 234 que está indicada por el índice EU como en Kabat et al.: G en la posición 775 a A en la posición 777
- posición 237 que está indicada por el índice EU como en Kabat et al.: G en la posición 781 a A en la posición 783

25

- posición 331 que está indicada por el índice EU como en Kabat et al.: T en la posición 1063 a C en la posición 1065

(2) Secuencia de aminoácidos de cadena pesada (SEC ID NO: 22)

5 MDWTWRILFL VAAATGAHSQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTG
 YYMHWVRQAP GQGLEWMGWI NPDSGGTNYA QKFQGRVTMT RDTSISTAYM
 ELNRLRSDDT AVYYCARDQP LGYCTNGVCS YFDYWGQGTL VTVSSASTKG
 PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSL SSVVTVPSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVRKKCCVE
 CPPCPAPPAA APSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN
~~WYVDGVEVHN AKTKPREEQE NSTFRVVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK~~
 GLPASIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD
 IAVEWESNGQ PENNYKTPP MLDSDGSEFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS
 VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K*

(i) Señal: M en la posición 1 a S en la posición 19

10 (ii) Región variable: Q en la posición 20 a S en la posición 145

(iii) Región constante: A en la posición 146 a K en la posición 471

- 15
- posición 234 que está indicada por el índice EU como en Kabat et al.: A en la posición 259
 - posición 237 que está indicada por el índice EU como en Kabat et al.: A en la posición 261
 - posición 331 que está indicada por el índice EU como en Kabat et al.: S en la posición 355

20 (3) Secuencia de DNA de cadena ligera (SEC ID NO: 25)

ATGAGGCTCC CTGCTCAGCT CCTGGGGCTC CTGCTGCTCT GGTTCACAGG
 TTCCAGATGC GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCTTCC GTGTCTGCAT
 CTGTAGGAGA CAGAGTCACC ATCACTTGTC GGGCGAGTCA GGGTATTTAC
 AGCTGGTTAG CCTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAACCTCCT
 GATCTATACT GCATCCACTT TACAAAGTGG GGTCCCATCA AGGTTACAGCG
 GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CAACTACTA TTGTCAACAG GCTAACATTT TCCCGCTCAC
 TTTCGGCGGA GGGACCAAGG TGGAGATCAA ACGTACGGTG GCTGCACCAT
 CTGTCTTCAT CTTCCCGCCA TCTGATGAGC AGTTGAAATC TGGAAGTACC
 TCTGTTGTGT GCCTGCTGAA TAACTTCTAT CCCAGAGAGG CCAAAGTACA
 GTGGAAGGTG GATAACGCCC TCCAATCGGG TAACTCCCAG GAGAGTGTCA
 CAGAGCAGGA CAGCAAGGAC AGCACCTACA GCCTCAGCAG CACCCTGACG
 CTGAGCAAAG CAGACTACGA GAAACACAAA GTCTACGCCT GCGAAGTCAC
 CCATCAGGGC CTGAGCTCGC CCGTCACAAA GAGCTTCAAC AGGGGAGAGT
 GT

(i) Señal: A en la posición 1 a C en la posición 60

25 (ii) Región variable: G en la posición 61 a T en la posición 384

(iii) Región constante: A en la posición 385 a T en la posición 702

(4) Secuencia de aminoácidos de cadena ligera (SEC ID NO: 26)

MRLPAQLLGL LLLWFFGSRC DIQMTQSPSS VSASVGDRVT ITCRASQGIY
 SWLAWYQQKP GKAPNLLIYT ASTLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP
 EDFATYYCQQ ANIFPLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA
 SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT
 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC*

- 5 (i) Señal: M en la posición 1 a C en la posición 20
- (ii) Región variable: D en la posición 21 a R en la posición 128
- 10 (iii) Región constante: T en la posición 129 a C en la posición 234

La presente invención se describe más abajo mediante los Ejemplos; sin embargo, la presente invención no está limitada a los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1

Construcción de vector de expresión

Entre los anticuerpos anti-CD40 descritos en el documento WO02/088186, se construyó un fragmento de ADN que comprende un ADN (SEC ID NO:3) de una región variable de cadena pesada de un anticuerpo (en adelante denominado en la presente memoria como "anticuerpo 341-1-19") producido mediante un hibridoma KM341-1-19 (nº de acceso BP-7759), y un fragmento de ADN que comprende un ADN (SEC ID NO:13) de una región variable de cadena ligera del anticuerpo.

De forma similar, entre los anticuerpos anti-CD40 descritos en el documento WO03/040170, WO03/040170, se construyó cada uno de un fragmento de ADN que comprende un ADN (SEC ID NO:23) de una región variable de cadena pesada de 21.4.1 (en adelante denominado en la presente memoria como "anticuerpo 21.4.1"), y un fragmento de ADN que comprende un ADN (SEC ID NO:27) de una región variable de cadena ligera del anticuerpo.

Se construyó un fragmento de ADN para que contuviese un ADN (en adelante denominado en la presente memoria como "IgG2-AAS/DNA") con adición de un codón de parada TGA a un ADN (SEC ID NO:29) que codifica IgG2 en el que valina en la posición 234, glicina en la posición 237 y prolina en la posición 331 se sustituyeron por alanina, alanina y serina, respectivamente (la numeración se basa en el índice EU de Kabat et al). Después, el fragmento de ADN resultante se introdujo en el vector N5KG2-Val Lark (IDEC Pharmaceuticals, en adelante denominado en la presente memoria como "vector N5KG2") que tiene una región constante IgG2. Esto es, un fragmento de ADN que comprende IgG2-AAS/DNA se escindió del fragmento de ADN usando *NheI* y *BamHI*, y se sustituyó por un ADN que codifica una región constante IgG2 del vector N5KG2. El vector de expresión resultante se denominó vector N5KG2/V234A/G237A/P331S. Además, el vector N5KG2-Val Lark que comprende un AND (en adelante denominado en la presente memoria como IgG2-S/DNA), en el que se añadió un codón de parada TGA a un ADN (SEC ID NO:31) que codifica IgG2 en el que prolina en la posición 331 se sustituyó por serina (la numeración se basa en el índice EU de Kabat et al), se construyó según el método descrito en el documento WO05/063981. Esto es, se construyó un fragmento de ADN que comprende IgG2-S/DNA, y se escindió de él un fragmento de ADN que comprende IgG2-S/DNA usando *NheI* y *BamHI*, seguido de la sustitución por un ADN que codifica una región constante IgG2 del vector N5KG2. El vector de expresión resultante se denominó como un vector N5KG2/P331S.

Este vector N5KG2/V234A/G237A/P331S y el vector N5KG2/P331S se digirieron con *BglII* y *BsWI*, respectivamente, y después se les insertó el fragmento de ADN que comprende un ADN de una región variable de cadena ligera del anticuerpo 341-1-19. A continuación, los vectores obtenidos se digirieron con *SalI* y *NheI*, y entonces se les insertó el fragmento de ADN que comprende un ADN de una región variable de cadena pesada del anticuerpo 341-1-19. Finalmente, se completaron los vectores de expresión que comprendieron una región variable del anticuerpo 341-1-19, y una región constante de cadena pesada que fue IgG2 en la que valina en la posición 234, glicina en la posición 237 y prolina en la posición 331 se sustituyeron por alanina, alanina y serina, respectivamente (la numeración se basa en el índice EU de Kabat et al), o fue IgG2 en la que prolina en la posición 331 se sustituyó por serina (la numeración se basa en el índice EU de Kabat et al) (cada uno de ellos se denominó como vector N5KG2/V234A/G237A/P331S-341 y vector N5KG2/P331S-341).

Además, los vectores N5KG2_V234A_G237A_P331S y N5KG2_P331S se digirieron con *BglII* y *BsWI*, respectivamente, y entonces el fragmento de ADN que comprende un ADN que codifica una región variable de cadena ligera del anticuerpo 21.4.1 y el fragmento de ADN que comprende un ADN que codifica una región variable de cadena pesada del anticuerpo 21.4.1 se insertaron de forma similar en el vector obtenido para completar de ese modo los vectores de expresión (se denominaron como vector N5KG2/V234A/G237A/P331S-21.4.1 y vector

N5KG2/P331S-21.4.1, respectivamente).

Ejemplo 2

5 Expresión y purificación de anticuerpo

El vector de expresión construido en el Ejemplo 1 se purificó usando EndoFree Plasmid Kit (Qiagen). Este vector de expresión se introdujo en células 293 suspendidas (Invitrogen Life Technologies) usando un FreeStyle™ 293 Expression System (Invitrogen Life Technologies), y se expresó transitoriamente para obtener de ese modo un sobrenadante de cultivo que contiene cada anticuerpo. El sobrenadante de cultivo (alrededor de 500 µg en términos de IgG) se filtró a través de un filtro de membrana (fabricado por Millipore) con un tamaño de poros de 0,22 µm, y entonces se cargó en HiTrap rProtein A FF (volumen de la columna: 1 ml) (Amersham Biosciences), que es una columna de afinidad para la purificación de anticuerpos. Después de lavar la columna con PBS(-), los anticuerpos se eluyeron con tampón de citrato 20 mM (pH 3,4) y se recuperaron en un tubo que contiene tampón de fosfato 200 mM (pH 7,0). Los anticuerpos obtenidos de las células en las que se introdujeron cada uno del vector N5KG2/V234A/G237A/P331S-341, vector N5KG2/P331S-341, vector N5KG2/V234A/G237A/P331S-21.4.1 y vector N5KG2/P331S-21.4.1 se denominaron como anticuerpo IgG2-AAS(341), anticuerpo IgG2-S(341), anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1) y anticuerpo IgG2-S(21.4.1), respectivamente.

20 **Ejemplo 3**

Actividad de unión del anticuerpo

A fin de investigar si cada uno de anticuerpo IgG2-AAS(341), anticuerpo IgG2-S(341), anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1) y anticuerpo IgG2-S(21.4.1) obtenido en el Ejemplo 2 se une a CD40 humano, se midió la actividad de unión del anticuerpo a célula Ramos (ATCC CRL-1596) que expresa CD40 humano.

La estirpe de células Ramos se suspendió en tampón de tinción (SB) de PBS que contiene 0,1% de NaN₃, 2 mM de EDTA, y 2% de FCS a una densidad de 2 x 10⁻⁶ células/ml. La suspensión celular (100 µl/pocillo) se dispuso en una placa de fondo redondo de 96 pocillos (fabricada por Becton Dickinson). Se le añadió el anticuerpo purificado (50 µl), seguido de la incubación a la temperatura del hielo durante 30 minutos. Como control negativo, se usó un anticuerpo anti-IgG2 humano frente a 2,4-dinitrofenol, y de forma similar se añadieron los anticuerpos purificados (50 µl), seguido de la incubación a la temperatura del hielo durante 15 minutos. Después de que las células se lavaron con SB, se les añadieron 50 µl de anticuerpos anti-humano marcados con fluorescencia R-PE diluidos 250 veces (fabricados por Southern Biotechnology), seguido de la incubación a la temperatura del hielo durante 15 minutos. Las células se lavaron dos veces con SB, y se suspendieron en 300 a 500 µl de tampón de FACS. La intensidad de la fluorescencia (MFI) de las células individuales se midió mediante FACS (FACScalibur, fabricado por Becton Dickinson).

40 Como resultado, se encontró que todos los anticuerpos se unen a CD40 humano (Figs. 1A y 1B).

Ejemplo 4

Actividad agonista del anticuerpo

45 Tanto el anticuerpo KM341-1-19 como el anticuerpo 21.4.1 son conocidos como anticuerpos agonistas. Por lo tanto, se examinó el efecto sobre la actividad agonista debido a la diferencia de una región constante de cadena pesada. Se encontró que la expresión de CD95 se elevó añadiendo el ligando de CD40 a células Ramos. En consecuencia, añadiendo el anticuerpo en lugar del ligando de CD40, se evaluó la actividad agonista de los anticuerpos usando como indicador la expresión de CD95 por los anticuerpos.

50 En primer lugar, se suspendieron 1,0 x 10⁻⁶ células/ml de células Ramos en un medio RPMI1640 que contiene 10% de suero fetal bovino, y se sembraron en una placa de 96 pocillos a 50 µl/pocillo. Los anticuerpos purificados se añadieron a una placa de 96 pocillos a 50 µl/pocillo. Tras el cultivo toda la noche a 37°C en presencia de 5% de CO₂, las células se recuperaron y se analizaron mediante FACS de la misma manera como en el Ejemplo 3, usando anticuerpos anti-CD95 marcados con R-PE (fabricados por Pharmingen, NJ).

60 Como resultado, tanto el anticuerpo IgG2-AAS(341) como el anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1) mostraron una actividad agonista notablemente mayor que los anticuerpos de referencia, anticuerpo IgG2-S(341) y anticuerpo IgG2-S(21.4.1) (Figs. 2A y 2B).

Ejemplo 5Tiempo de residencia en sangre de los anticuerpos

5 A fin de examinar el tiempo de residencia en sangre en el organismo vivo del anticuerpo IgG2-AAS(341) y del anticuerpo IgG2-S(341) preparados en el Ejemplo 2, cada uno de estos anticuerpos se administró intravenosamente a *Macaca fascicularis*, y se midió periódicamente la concentración de fármaco en suero.

10 El anticuerpo IgG2-AAS(341) o el anticuerpo IgG2-S(341) (1 mg/kg) se administró intravenosamente. Se recogieron muestras de sangre de la vena antes de la administración y después de la administración, se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 20 a 60 minutos, y después se centrifugaron (temperatura ambiente, 3000 rpm, 15 minutos) para obtener sueros que se conservaron en un congelador de temperatura ultrabaja durante un período hasta la medición.

15 La concentración de fármaco en suero se midió mediante el método de ELISA. Se diluyó una proteína de fusión CD40 humano-Fc humana (preparada haciendo referencia al Ejemplo 1 de la memoria descriptiva del documento WO02/088186) con disolución salina tamponada con Tris (nº de Catálogo de SIGMA, T6664) para dar una concentración de 1 µg/ml, se añadieron 100 µl de la disolución obtenida a cada pocillo de Immuno Plate (nº de Catálogo de Greiner 675097), y entonces se incubó toda la noche a 4°C. La disolución en los pocillos se descartó, y la humedad en ellos se eliminó a conciencia. Tras añadir 300 µl de disolución salina tamponada con Tris que contiene 1% de BSA (nº de catálogo de SIGMA A7638), se llevó a cabo la incubación toda la noche a 4°C. Un suero de mono se diluyó 20 veces con disolución salina tamponada con Tris que contiene 1% de BSA. La disolución en los pocillos se descartó, la humedad en ellos se eliminó a conciencia, y se añadieron a cada pocillo 100 µl del suero diluido mencionado anteriormente, y se incubó toda la noche a 4°C. Cada pocillo se lavó 5 veces con 300 µl de disolución salina tamponada con Tris que contiene 0,1% de Tween 20 y 0,5 moles/l de NaCl, y la humedad se eliminó a conciencia. IgG de cabra anti-cadena ligera Kappa humana-biotina (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., nº de catálogo 17249) se diluyó hasta 20 ng/ml con disolución salina tamponada con Tris que contiene 1% de BSA, se añadieron 100 µl de la disolución obtenida a cada pocillo, y entonces se dejó reposar a temperatura ambiente durante alrededor de 2 horas. Se añadió una gota de cada uno del reactivo A y del reactivo B unido al Streptavidine-ABComplex/AP (nº de catálogo de DACO K0391) a 5 ml de 50 mmoles/l de Tris-HCl (pH 7,6), y entonces se dejó reposar en un lugar frío y oscuro durante 30 minutos o más. Esta disolución se diluyó 51 veces con tampón diluyente de muestras. Cada pocillo se lavó 5 veces con 300 µl de disolución salina tamponada con Tris que contiene 0,1% de Tween 20 y 0,5 moles/l de NaCl, y la humedad se eliminó a conciencia. A cada pocillo, se añadieron 100 µl del líquido de dilución Streptavidine-ABComplex/AP mencionado anteriormente, y entonces se dejó reposar a temperatura ambiente durante alrededor de 1 hora. Cada pocillo se lavó 5 veces con 300 µl de disolución salina tamponada con Tris que contiene 0,1% de Tween 20 y 0,5 moles/l de NaCl, y la humedad se eliminó a conciencia. El Lumi-phos 530 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., nº de catálogo 537-24662) se diluyó dos veces con una disolución acuosa (pH 10) que contiene 0,1% de dietanolamina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., nº de catálogo 093-03115), 1 mmol/l de MgCl₂ y 0,02% de NaN₃, y se añadieron 100 µl de la disolución obtenida a cada pocillo. Tras mezclar durante alrededor de 15 segundos usando un agitador de placa, la disolución se incubó a 30°C durante 20 minutos. La concentración de anticuerpo se determinó midiendo la intensidad de la quimioluminiscencia. A este respecto, la temperatura del lector de la placa se ajustó a 30°C durante la medida.

45 Como resultado, se encontró que el tiempo de residencia en sangre del anticuerpo IgG2-AAS(341) se prolongó en comparación con el anticuerpo IgG2-S(341) (figura 3).

Ejemplo 6Parámetros bioquímicos sanguíneos tras la administración del anticuerpo

50 A fin de examinar las influencias del anticuerpo IgG2-AAS(341) y del anticuerpo IgG2-S(341) preparados en el Ejemplo 2 sobre los parámetros bioquímicos sanguíneos en los individuos a los que se administró el anticuerpo, cada uno de estos anticuerpos se administró intravenosamente a un ratón transgénico BAC con CD40 humano, y se midió periódicamente la concentración de anticuerpo en suero.

55 En primer lugar, se prepararon ratones transgénicos BAC con CD40 humano. Un clon de BAC (cromosoma artificial bacteriano) cíclico que comprende un gen de CD40 humano se purificó mediante una columna de intercambio aniónico (MACHEREY-NAGEL; # 740579), y la disolución de ADN se microinyectó en el pronúcleo del óvulo fertilizado de ratón C57BL/6J Jcl (CLEA Japan Inc). Los individuos se prepararon transplantando el óvulo fertilizado con el ADN inyectado a un oviducto de un ratón hembra en estado de pseudoembarazo. La punta de la cola de cada uno de los individuos así obtenidos se digirió toda la noche con una proteasa K/SDS, y entonces se preparó un ADN genómico mediante extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol. Una porción de la región del gen de CD40 humano se amplificó mediante PCR usando como molde el ADN genómico así obtenido, y se seleccionó un individuo que tiene el gen de CD40 humano. Usando un capilar revestido con heparina, se recogieron 50 µl de la sangre periférica de este ratón, se mezclaron con 10 µl de anticuerpo anti-CD40 humano marcado con PE (Beckman

Coulter; IM1936U) y se incubó a temperatura del hielo durante 15 minutos. Después, llevando a cabo la hemolisis y la inmovilización usando FACS Lysing Solution (BD), se midió la fluorescencia mediante FACS (FACScalibur, Becton Dickinson). Como resultado, se encontró que el CD40 humano se expresó en células B, en células mononucleares y en plaquetas, que se sabe generalmente que expresan CD40.

5 A continuación, el anticuerpo IgG2-AAS(341) o el anticuerpo IgG2-S(341) se diluyó con tampón de fosfato y se administró a un ratón transgénico BAC con CD40 humano (cuatro animales para cada anticuerpo) a través de la vena caudal (10 µg/cabeza (se administró una disolución de 50 µg/ml a una dosis de 200 µl/cabeza)). Se recogieron muestras de sangre de las venas en los puntos antes de la administración y 15 horas, 24 horas y 39 horas después de la administración. Los sueros sanguíneos se obtuvieron llevando a cabo la centrifugación (temperatura ambiente, 9000 rpm, 2 minutos). Los sueros así obtenidos se conservaron en un congelador de temperatura ultrabaja durante el período hasta la medición. Cada suero se diluyó 50 veces con tampón de fosfato, y AST y ALT se midieron usando TA-LN KAINOS (KAINOS Laboratories Inc., nº de catálogo TDR5100) mediante los métodos descritos en los documentos adjuntos.

15 Como resultado, se encontró que las concentraciones de AST y ALT se reducen por el anticuerpo IgG2-AAS(341) en comparación con el anticuerpo IgG2-S(341) (figura 4A y figura 4B).

20 **Ejemplo 7**

Actividad inhibidora del crecimiento del anticuerpo para célula tumoral

25 Células T24 (ATCC # HTB-4) se ajustaron para dar una densidad de $1,0 \times 10^5$ células/ml usando medio RPMI 1640 (nº de catálogo de GIBCO 31800105) que contiene 10% de suero fetal bovino (nº de catálogo de Invitrogen 10099-141), y se dispensaron en una placa de 96 pocillos a 50 µl/pocillo. El anticuerpo IgG2-AAS(341) preparado en el Ejemplo 2 se diluyó, se añadió a la placa de 96 pocillos a 50 µl/pocillo y se cultivó a 37°C durante 3 días en presencia de 5% de CO₂. Se le añadió Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay (nº de catálogo de Promega G7570) a 100 µl/pocillo, y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. La señal de emisión se midió usando SpectraMax M5, y la relación del número de células que sobrevivieron a cada concentración se calculó en relación con el número de células que sobrevivieron cuando el anticuerpo no se añadió como 100%. Como resultado, se encontró que el anticuerpo IgG2-AAS(341) inhibió el crecimiento de las células T24 de una manera dependiente de la concentración.

35 A continuación se describen las secuencias parciales de ADN y de aminoácidos del anticuerpo de la presente invención.

Secuencia de ADN de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341) (SEC ID NO:1)

ATGTCTGTCT CCTTCCTCAT CTTCCCTGCC GTGCTGGGCC TCCCATGGGG
 TGTCCCTGTCA CAGGTCCAAC TGCAGCAGTC AGGTCCAGGA CTGGTGAAGC
 CCTCGCAGAC CCTCTCACTC ACCTGTGCCA TCTCCGGGGA CAGTGTCTCT
 AGCAACAGTG CTACTIONTGGAA CTGGATCAGG CAGTCCCCAT CGAGAGACCT
 TGAGTGGCTG GGAAGGACAT ACTACAGGTC CAAGTGGTAT CGTGATTATG
 TAGGATCTGT GAAAAGTCGA ATAATCATCA ACCCAGACAC ATCCAACAAC
 CAGTTCTCCC TGCAGCTGAA CTCTGTGACT CCCGAGGACA CGGCTATATA
 TTACTGTACA AGAGCACAGT GGCTGGGAGG GGATTACCCC TACTACTACA

40

GTATGGACGT CTGGGGCCAA GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCAGCTAGC
 ACCAAGGGCC CATCGGTCTT CCCCCTGGCG CCCTGCTCCA GGAGCACCTC
 CGAGAGCACA GCGGCCCTGG GCTGCCTGGT CAAGGACTAC TTCCCCGAAC
 CGGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCTC TGACCAGCGG CGTGCACACC
 TTCCCAGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC TACTCCCTCA GCAGCGTGGT
 GACCGTGCCC TCCAGCAACT TCGGCACCCA GACCTACACC TGCAACGTAG
 ATCACAAGCC CAGCAACACC AAGGTGGACA AGACAGTTGA GCGCAAATGT
 TGTGTCGAGT GCCCACCCTG CCCAGCACCA CCTGCAGCAG CACCGTCAGT
 CTTCCTCTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC
 CTGAGGTCAC GTGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCCAGGGTC
 CAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA
 GCCACGGGAG GAGCAGTTCA ACAGCACGTT CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA
 CCGTTGTGCA CCAGGACTGG CTGAACGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC
 TCCAACAAAG GCCTCCCAGC CTCCATCGAG AAAACCATCT CCAAACCAA
 AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA TCCCGGGAGG
 AGATGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAC
 CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA
 CTACAAGACC ACACCTCCCA TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCCTCT
 ACAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC
 TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCACTACA CGCAGAAGAG
 CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA AA

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341) (SEC ID NO:2)

MSVSFLIFLP VLGLPWGVLV QVQLQQSGFG LVKPSQTLVL TCAISGDSVS
 SNSATWNWIR QSPSRDLEWL GRITYRSKWY RYVGSVKSRI IINPDTSNN
 QFSLQLNSVT PEDTAIYYCT RAQWLGGDYP YYYSMDVWVWQ GTTVTVSSAS
 TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT
 FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVERKC
 CVECPCPAP PAAAPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV
 QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV
 SNKGLPASIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY
 PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLDSGDS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF
 5 SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK

Secuencia de ADN de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341) (SEC ID NO:3)

CAGGTCCAAC TGCAGCAGTC AGGTCCAGGA CTGGTGAAGC CCTCGCAGAC
 CCTCTCACTC ACCTGTGCCA TCTCCGGGGA CAGTGTCTCT AGCAACAGTG
 10 CTACTIONTGGAA CTGGATCAGG CAGTCCCATC CGAGAGACCT TGAGTGGCTG
 GGAAGGACAT ACTACAGGTC CAAGTGGTAT CGTGATTATG TAGGATCTGT
 GAAAAGTCGA ATAATCATCA ACCCAGACAC ATCCAACAAC CAGTTCTCCC
 TGCAGCTGAA CTCTGTGACT CCCGAGGACA CGGCTATATA TTACTIONTGTACA
 AGAGCACAGT GGCTGGGAGG GGATTACCCC TACTACTACA GTATGGACGT
 CTGGGGCCAA GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCA

ES 2 561 081 T3

Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341) (SEC ID NO:4)

QVQLQQSGPG LVKPSQTL~~SL~~ TCAISGDSVS SNSATWNWIR QSPSRDLEWL
GRYYRSKWY R~~Y~~VG~~S~~VKSR IIINPDT~~S~~NN Q~~F~~SLQLNSVT PEDTAIYYCT
RAQWLGGDYP YYYSMDVWGQ GTT~~V~~TVSSR

5 Secuencia de ADN de CDR1 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341) (SEC ID NO:5)

AGCAACAGTG CTA~~CT~~TGGAA C

10 Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341) (SEC ID NO:6)

SNSATWN

15 Secuencia de ADN de CDR2 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341) (SEC ID NO:7)

AGGACAT ACTACAGGTC CAAGTGGTAT CGTGATTATG TAGGATCTGT GAAAAGT

20 Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(34) (SEC ID NO:8)

RTYYRSKWY R~~Y~~VG~~S~~VKS

25 Secuencia de ADN de CDR3 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341) (SEC ID NO:9)

GCACAGT GGCTGGGAGG GGATTACCCC TACTACTACA GTATGGACGT C

30 Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341) (SEC ID NO:10)

AQWLGGDYP YYYSMDV

35 secuencia de ADN de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341) (SEC ID NO:11)

ATGGAAGCCC CAGCTCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA
TACCACCGGA GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT
CTCCAGGGGA AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC
AGCTACTTAG CCTGGTACCA ACAGAAACCT GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT
CATCTATGAT GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC AGGTTCAGTG
GCAGTGGGTC TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT
GAAGATTTTG CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACA CTTTCGGCCC
TGGGACCAA GTGGATATCA AACGTACGGT GGCTGCACCA TCTGTCTTCA
TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGA~~ACT~~GC CTCTGTTGTG
TGCC~~T~~GCTGA ATA~~ACT~~TCTA TCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAAGGT
GGATAACGCC CTCCAATCGG GTA~~ACT~~CCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG
ACAGCAAGGA CAGCACCTAC AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA
GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC TCGGAAGTCA CCCATCAGGG
CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG TGT

40

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341) (SEC ID NO:12)

MEAPAQLLFL LLLWLDPDTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS
 SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP
 EDFAVYYCQQ RSNTFGPGTK VDIKRTVAAP SVFIFPPSDE QLKSGTASVV
 CLLNMFYPRE AKVQWKVDNA LQSGNSQESV TEQDSKDSTY SLSSTLTLSK
 ADYEKHKVYA CEVTHQGLSS PVTKSFNRGE C

5 Secuencia de ADN de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341) (SEC ID NO:13)

GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA
 AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCTACTTAG
 CCTGGTACCA ACAGAAACCT GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT
 GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC AGGTCAGTG GCAGTGGGTC
 TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT GAAGATTTTG
 CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACA CTTTCGGCCC TGGGACCAAA
 GTGGATATCA AA

Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341) (SEC ID NO:14)

10

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP
 GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ
 RSNTFGPGTK
 VDIK

Secuencia de ADN de CDR1 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341) (SEC ID NO:15)

15

A GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCTACTTAG CC

Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341) (SEC ID NO:16)

20

RASQSVS SYLA

Secuencia de ADN de CDR2 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341) (SEC ID NO:17)

25

GAT GCATCCAACA GGGCCACT

Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341) (SEC ID NO:18)

30

D ASNRAT

Secuencia de ADN de CDR3 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341) (SEC ID NO:19)

35

CAGCAG CGTAGCAACA CT

Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341) (SEC ID NO:20)

40

QQ RSNT

Secuencia de ADN de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1) (SEC ID NO:21)

ATGGACTGGA CCTGGAGGAT CCTCTTCTTG GTGGCAGCAG CCACAGGAGC
 CCACTCCCAG GTGCAGCTGG TGCAGTCTGG GGCTGAGGTG AAGAAGCCTG
 GGGCCTCAGT GAAGGTCTCC TGCAAGGCTT CTGGATACAC CTTACCCGGC
 TACTATATGC ACTGGGTGCG ACAGGCCCTT GGACAAGGGC TTGAgtGGAT
 GGGATGGATC AACCTGACA GTGGTGGCAC AAATATGCA CAGAAGTTTC
 AGGGCAGGGT CACCATGACC AGGGACACGT CCATCAGCAC AGCCTACATG
 GAGCTGAACA GGCTGAGATC TGACGACACG GCCGTGTATT ACTGTGCGAG
 AGATCAGCCC CTAGGATATT GACTAATGG TGTATGCTCC TACTTTGACT
 ACTGGGGCCA GGAACCCTG GTCACCGTCT CCTCAGCTAG CACCAAGGGC
 CCATCGGTCT TCCCCCTGGC GCCCTGCTCC AGGAGCACCT CCGAGAGCAC
 AGCGGCCCTG GGCTGCCTGG TCAAGGACTA CTCCCCGAA CCGGTGACGG
 TGTCGTGGAA CTCAGGCGCT CTGACCAGCG GCGTGCACAC CTTCCCAGCT
 GTCCTACAGT CCTCAGGACT CTACTCCCTC AGCAGCGTGG TGACCGTGCC
 CTCCAGCAAC TTCGGCACCC AGACCTACAC CTGCAACGTA GATCACAAGC
 CCAGCAACAC CAAGGTGGAC AAGACAGTTG AGCGCAAATG TTGTGTCGAG
 TGCCCACCGT GCCCAGCACC ACCTGCAGCA GCACCGTCAG TCTTCCTCTT
 CCCCCAAA CCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
 CGTGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCCGAGGT CCAGTCAAC
 TGGTACGTGG ACGGCGTGGG GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCACGGGA
 GGAGCAGTTC AACAGCACGT TCCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTTGTGC
 ACCAGGACTG GCTGAACGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA
 GGCTCCCAG CCTCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAACCA AAGGGCAGCC
 CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA
 AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA CCCCAGCGAC
 ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC
 CACACCTCC ATGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTCCTC TACAGCAAGC
 TCACCGTGG CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC
 GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT
 GTCTCCGGGT AAA

5 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1) (SEC ID NO:22)

MDWTWRILFL VAAATGAHSQ VQLVQSGAEV KKPASVVKVS CKASGYTFTG
 YMHWRQAP GQGLEWGWMI NPDSGGTNYA QKFQGRVTMT RDTISSTAYM
 ELNRLRSDDT AVYYCARDQP LGYCTNGVCS YFDYWGQGL VTVSSASTKG
 PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSL SSVVTVPSN FGTQYTCNV DHKPSNTKVD KTKVERKCCVE
 CPPCPAPPAA APSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN
 WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTFRVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK
 GLPASIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFPYPSD
 IAVEWESNGQ PENNYKTTTP MLDSDSGFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFCSS
 VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

Secuencia de ADN de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1) (SEC ID NO:23)

CAG

GTGCAGCTGG TGCAGTCTGG GGCTGAGGTG AAGAAGCCTG GGGCCTCAGT
 GAAGGTCTCC TGCAAGGCTT CTGGATACAC CTCACCGGC TACTATATGC
 ACTGGGTGCG ACAGGCCCTT GGACAAGGGC TTGAgtGGAT GGGATGGATC
 AACCTGACA GTGGTGGCAC AAACATGCA CAGAAGTTTC AGGGCAGGGT
 CACCATGACC AGGGACACGT CCATCAGCAC AGCCTACATG GAGCTGAACA
 GGCTGAGATC TGACGACACG GCCGTGTATT ACTGTGCGAG AGATCAGCCC
 CTAGGATATT GTAATAATGG TGTATGCTCC TACTTTGACT ACTGGGGCCA
 GGAACCCTG GTCACCGTCT CCTCA

5 Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1) (SEC ID NO:24)

Q VQLVQSGAEV KKPASVKVS CKASGYTFTG YMHWVRQAP GQGLEWMGWI
 NPDSGGTNYA QKFQGRVTMT RDTISSTAYM ELNRLRSDDT AVYYCARDQP
 LGYCTNGVCS YFDYWGQGL VTVSS

10 Secuencia de ADN de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1) (SEC ID NO:25)

ATGAGGCTCC CTGCTCAGCT CCTGGGGCTC CTGCTGCTCT GGTCCCAGG
 TTCCAGATGC GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCTTCC GTGTCTGCAT
 CTGTAGGAGA CAGAGTCACC ATCACTTGTC GGGCGAGTCA GGGTATTTAC
 AGCTGGTTAG CCTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAACCTCCT
 GATCTATACT GCATCCACTT TACAAAGTGG GGTCCCATCA AGGTTCAGCG
 GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CAACTTACTA TTGTCAACAG GCTAACATTT TCCCGCTCAC
 TTTCGGCGGA GGGACCAAGG TGGAGATCAA ACGTACGGTG GCTGCACCAT
 CTGTCTTCAT CTTCCCGCCA TCTGATGAGC AGTTGAAATC TGGAAGTACC
 TCTGTTGTGT GCCTGCTGAA TAACTTCTAT CCCAGAGAGG CCAAAGTACA
 GTGGAAGGTG GATAACGCCC TCCAATCGGG TAACTCCCAG GAGAGTGTC
 CAGAGCAGGA CAGCAAGGAC AGCACCTACA GCCTCAGCAG CACCCTGACG
 CTGAGCAAAG CAGACTACGA GAAACACAAA GTCTACGCCT GCGAAGTCAC
 CCATCAGGGC CTGAGCTCGC CCGTCACAAA GAGCTTCAAC AGGGGAGAGT GT

15 Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1) (SEC ID NO:26)

MRLPAQLLGL LLLWFPGSRC DIQMTQSPSS VSASVGDRVIT ITCRASQGIY
 SWLAWYQQKP GKAPNLLIYT ASTLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP
 EDFATYYCQQ ANIFPLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA
 SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT
 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK

Secuencia de ADN de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1) (SEC ID NO:27)

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCTTCC GTGTCTGCAT CTGTAGGAGA
 CAGAGTCACC ATCACTTGTC GGGCGAGTCA GGGTATTTAC AGCTGGTTAG
 CCTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAACCTCCT GATCTATACT
 GCATCCACTT TACAAAGTGG GGTCCCATCA AGGTTTCAGCG GCAGTGGATC
 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAACCT GAAGATTTTG
 CAACTTACTA TTGTCAACAG GCTAACATTT TCCCGCTCAC TTTCGGCGGA
 GGGACCAAGG TGGAGATCAA ACGT

5 Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1) (SEC ID NO:28)

DIQMTQSPSS VSASVGDRVT ITCRASQGIY SWLAWYQQKP GKAPNLLIYT
 ASTLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ ANIFPLTFGG
 GTKVEIKR

10 Secuencia de ADN de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341) (SEC ID NO:29)

GCTAGC ACCAAGGGCC CATCGGTCTT CCCCCTGGCG CCCTGCTCCA
 GGAGCACCTC CGAGAGCACA GCGGCCCTGG GCTGCCTGGT CAAGGACTAC
 TTCCCCGAAC CGGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCTC TGACCAGCGG
 CGTGACACACC TTCCCAGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC TACTCCCTCA
 GCAGCGTGGT GACCGTGCCC TCCAGCAACT TCGGCACCCA GACCTACACC
 TGCAACGTAG ATCACAAGCC CAGCAACACC AAGGTGGACA AGACAGTTGA
 GCGCAAATGT TGTGTGCGAGT GCCCACCCTG CCCAGCACCA CCTGCAGCAG
 CACCGTCAGT CTTCCCTCTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC
 TCCCGGACCC CTGAGGTCAC GTGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGA
 CCCCAGGGTC CAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG
 CCAAGACAAA GCCACGGGAG GAGCAGTTCA ACAGCACGTT CCGTGTGGTC
 AGCGTCCTCA CCGTTGTGCA CCAGGACTGG CTGAACGGCA AGGAGTACAA
 GTGCAAGGTC TCCAACAAAG GCCTCCCAGC CTCATCGAG AAAACCATCT
 CCAAACCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA
 TCCCGGGAGG AGATGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA
 AGGCTTCTAC CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGC
 CGGAGAACAA CTACAAGACC ACACCTCCCA TGCTGGACTC CGACGGCTCC
 TTCTTCCTCT ACAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG
 GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCACTACA
 CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA AA

15

Secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341) (SEC ID NO:30)

ASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA
 LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD
 KTVKCCVE CPPCPAPPAA APSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV
 SHEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTFRVSVL TVVHQDWLNG
 KEYKCKVSNK GLPASIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT
 CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP MLDSGDSFFL YSKLTVDKSR
 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K DNA sequence of the heavy chain

5

región constante del anticuerpo IgG2-S(341) (SEC ID NO:31)

GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCG
 CCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA
 CTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACA
 CCTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG
 CCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAA
 CACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGAGTGCCCACCGTGCCAG
 CACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTC
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTCGCTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
 CGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
 CACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAAGCGTCTCACCCTGTGCAC
 CAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGC
 CTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACA
 CCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTC
 AAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA
 CAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCA
 AGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
 CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA

10

Secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-S(341) (SEC ID NO:32)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY
 FPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSN
 TKVDKTVKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDP
 EVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPA
 SIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGOPEN
 NYKTTPPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

15

Secuencia de aminoácidos del alotipo 1 de IgG2 (SEC ID NO:33)

ASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA
 LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD
 KTVKCCVE CPPCPAPPVA GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV
 SHEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTFRVSVL TVVHQDWLNG
 KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT
 CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP MLDSGDSFFL YSKLTVDKSR
 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

Secuencia de aminoácidos del alotipo 2 de IgG2 (SEC ID NO:34)

ASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA
 LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVTSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD
 KTVKCCVE CPPCPAPPVA GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV
 SHEDPEVQFN WYVDGMEVHN AKTKPREEQF NSTFRVSVL TVVHODWLNG
 KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT
 CLVKGFPYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP MLDSGDSFFL YSKLTVDKSR
 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

5

Secuencia de aminoácidos del alotipo 3 de IgG2 (SEC ID NO:35)

ASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA
 LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS LGTQTYTCNV DHKPSNTKVD
 KTVKCCVE CPPCPAPPVA GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV
 SHEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTFRVSVL TVVHODWLNG
 KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT
 CLVKGFPYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP MLDSGDSFFL YSKLTVDKSR
 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

10 Esta solicitud se basa en la solicitud provisional U.S. presentada el 20 de abril de 2009 (solicitud provisional U.S. nº 61/170.738).

Aplicabilidad industrial

15 La presente invención puede proporcionar un anticuerpo monoclonal que comprende una región constante de cadena pesada que es IgG2 en la que valina en la posición 234, glicina en la posición 237 y prolina en la posición 331 se sustituyen al menos por alanina, alanina y serina, respectivamente (la numeración se basa en el índice EU de Kabat et al.); tiene actividad agonista; y se une a CD40 humano; un ADN que codifica el anticuerpo monoclonal; un vector que comprende el ADN; un transformante obtenible introduciendo el vector; un método para producir el anticuerpo monoclonal que comprende el uso del transformante; y una composición farmacéutica y un agente terapéutico que comprenden el anticuerpo monoclonal.

20

Texto libre de listado de secuencias

25 SEC ID NO:1 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - Secuencia de ADN de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341)

30 SEC ID NO:2 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341)

SEC ID NO:3 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - Secuencia de ADN de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341)

35 SEC ID NO:4 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341)

SEC ID NO:5 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - Secuencia de ADN de CDR1 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341)

40 SEC ID NO:6 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341)

SEC ID NO:7 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - Secuencia de ADN de CDR2 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341)

45 SEC ID NO:8 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341)

ES 2 561 081 T3

- SEC ID NO:9 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - Secuencia de ADN de CDR3 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341)
- 5 SEC ID NO:10 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341)
- SEC ID NO:11 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - secuencia de ADN de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341)
- 10 SEC ID NO:12 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341)
- SEC ID NO:13 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - Secuencia de ADN de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341)
- 15 SEC ID NO:14 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341)
- SEC ID NO:15 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - Secuencia de ADN de CDR1 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341)
- 20 SEC ID NO:16 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341)
- SEC ID NO:17 - Descripción de secuencia artificial: Secuencia de ADN de CDR2 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341)
- 25 SEC ID NO:18 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341)
- 30 SEC ID NO:19 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - Secuencia de ADN de CDR3 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341)
- SEC ID NO:20 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341)
- 35 SEC ID NO:21 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - secuencia de ADN de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1)
- SEC ID NO:22 - Descripción de secuencia artificial: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1)
- 40 SEC ID NO:23 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - Secuencia de ADN de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1)
- 45 SEC ID NO:24 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1)
- SEC ID NO:25 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - secuencia de ADN de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1)
- 50 SEC ID NO:26 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1)
- SEC ID NO:27 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - Secuencia de ADN de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1)
- 55 SEC ID NO:28 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1)
- 60 SEC ID NO:29 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - Secuencia de ADN de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341)
- SEC ID NO:30 - Descripción de secuencia artificial: IgG2 - Secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341)
- 65

SEC ID NO:31 - Descripción de secuencia artificial: Secuencia de ADN de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-S(341)

5 SEC ID NO:32 - Descripción de secuencia artificial: Secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-S(341)

Listado de secuencias

- 10 <110> KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD.
- <120> ANTICUERPO QUE COMPRENDE IgG2 EN EL QUE SE INTRODUCEN MUTACIONES DE AMINOÁCIDOS
- <130> WO69551
- 15 <150> US 61/170,738
- <151> 2009-04-20
- <160> 37
- 20 <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 1422
- <212> ADN
- 25 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia de ADN de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341)

30 <400> 1

atgtctgtct ccttcctcat cttcctgccc gtgctgggcc tcccatgggg tgtcctgtca	60
caggccaac tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc	120
acctgtgcca tctccgggga cagtgtctct agcaacagtg ctacttggaa ctggatcagg	180
cagtccccat cgagagacct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtggat	240
cgtgattatg taggatctgt gaaaagtcca ataatcatca acccagacac atccaacaac	300
cagttctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctatata ttactgtaca	360
agagcacagt ggctgggagg ggattacccc tactactaca gtatggacgt ctggggccaa	420
gggaccacgg tcaccgtctc ctcagctagc accaagggcc catcggctct ccccctggcg	480
ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca gcggccctgg gctgcctggt caaggactac	540
ttccccgaac cggtagcggg gtcgtggaac tcaggcgctc tgaccagcgg cgtgcacacc	600
ttcccagctg tcctacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc	660
tccagcaact tcggcaccca gacctacacc tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc	720
aaggtggaca agacagttga gcgcaaatgt tgtgtcgagt gcccaaccgtg cccagcacca	780
cctgcagcag caccgtcagt ctctctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc	840
tcccggaccc ctgaggtcac gtgctgggtg gtggacgtga gccacgaaga ccccaggtc	900
cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag	960
gagcagttca acagcacgtt ccgtgtggtc agcgtcctca ccgttgtgca ccaggactgg	1020
ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag gcctcccagc ctccatcgag	1080
aaaaccatct ccaaaaccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca	1140

ES 2 561 081 T3

tccccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa aggctttctac 1200
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1260
acacctccca tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac 1320
aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1380
aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa 1422

<210> 2
<211> 474
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341)

<400> 2
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 Ala Ala Ala 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 Ser 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

ES 2 561 081 T3

	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			

5 <210> 3
 <211> 384
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de ADN de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341)

<400> 3
 caggccaac tgcagcagtc aggtccagga ctggggaagc cctcgcagac cctctcactc 60
 acctgtgcca tctccgggga cagtgtctct agcaacagtg ctacttggaa ctggatcagg 120
 cagtcccat cgagagacct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtggat 180
 cgtgattatg taggatctgt gaaaagtoga ataatcatca acccagacac atccaacaac 240
 cagttctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctatata ttactgtaca 300
 agagcacagt ggctgggagg ggattacccc tactactaca gtatggacgt ctggggccaa 360
 gggaccacgg tcaccgtctc ctca 384

15 <210> 4
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341)

<400> 4
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Ser Ala Thr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Asp Leu Glu
 35 40 45

ES 2 561 081 T3

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Arg Asp Tyr Val
 50 55 60

Gly Ser Val Lys Ser Arg Ile Ile Ile Asn Pro Asp Thr Ser Asn Asn
 65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Ile
 85 90 95

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ala Gln Trp Leu Gly Gly Asp Tyr Pro Tyr Tyr
 100 105 110

Tyr Ser Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

- 5 <210> 5
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Secuencia de ADN de CDR1 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341)

- <400> 5
- agcaacagtg ctactggaa c 21

- 15 <210> 6
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 20 <220>
- <223> Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341)

- <400> 6
- Ser Asn Ser Ala Thr Trp Asn**
- 1 5**

- 25 <210> 7
- <211> 54
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 30 <220>
- <223> Secuencia de ADN de CDR2 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341)

- <400> 7
- aggacatact acaggtccaa gtggtatcgt gattatgtag gatctgtgaa aagt 54

- 40 <210> 8
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 45 <220>
- <223> Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341)

ES 2 561 081 T3

<400> 8
Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Arg Asp Tyr Val Gly Ser Val
1 5 10 15

Lys Ser

5 <210> 9
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de ADN de CDR3 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341)

<400> 9
 gcacagtggc tgggagggga ttaccctac tactacagta tggacgtc 48

15 <210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341)

<400> 10
Ala Gln Trp Leu Gly Gly Asp Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Val
1 5 10 15

25 <210> 11
 <211> 693
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de ADN de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341)

35 <400> 11
 atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
 ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaaca ctttcggccc tgggaccaa 360
 gtggatatca aacgtacggt ggctgcacca tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag 420
 cagttgaaat ctggaactgc ctctgtttgt tgcctgctga ataacttcta tcccagagag 480
 gccaaagtac agtggaggt ggataacgcc ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc 540
 acagagcagg acagcaagga cagcacctac agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa 600
 gcagactacg agaaacaaa agtctacgcc tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg 660
 cccgtcacia agagcttcaa caggggagag tgt 693

40 <210> 12
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 561 081 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341)

5 <400> 12

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

Asn Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala
115 120 125

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
130 135 140

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu

145 150 155 160

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
165 170 175

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
180 185 190

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
195 200 205

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

10 <210> 13

<211> 312

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

ES 2 561 081 T3

<223> Secuencia de ADN de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341)

<400> 13
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaaca ctttcggccc tgggaccaa 300
gtggatatca aa 312

5

<210> 14
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341)

<400> 14
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Thr Phe Gly
85 90 95

Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100

20

<210> 15
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Secuencia de ADN de CDR1 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341)

<400> 15
agggccagtc agagtgttag cagctactta gcc 33

30

<210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de CDR1 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341)

ES 2 561 081 T3

<400> 16
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

5 <210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de ADN de CDR2 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341)

<400> 17
 gatgcatcca acagggccac t 21

15 <210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de CDR2 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341)

<400> 18
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

25 <210> 19
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de ADN de CDR3 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341)

35 <400> 19
 cagcagcgta gcaacact 18

40 <210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de CDR3 de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(341)

45 <400> 20
Gln Gln Arg Ser Asn Thr
1 5

50 <210> 21
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de ADN de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1)

55 <400> 21

ES 2 561 081 T3

```

atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccaactcccag      60
gtgcagctgg tgcagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc      120
tgcaaggctt ctggatacac cttcaccggc tactatatgc actgggtgcg acaggcccct      180
ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc aaccctgaca gtggtggcac aaactatgca      240
cagaagtffc agggcagggt caccatgacc agggacacgt ccatcagcac agcctacatg      300
gagctgaaca ggctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag agatcagccc      360
ctaggatatt gtactaatgg tgtatgctcc tactttgact actggggcca ggaaccctg      420
gtcaccgtct cctcagctag caccaagggc ccatcggctc tccccctggc gccttgctcc      480
aggagcacct ccgagagcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa      540
ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgtc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct      600
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcaac      660
ttcggcaccg agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac      720
aagacagttg agcgcaaatg ttgtgtcgag tgcccaccgt gcccagcacc acctgcagca      780
gcaccgtcag tcttctctct cccccaaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc      840
cctgaggtca cgtgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accccgaggt ccagttcaac      900
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccacggga ggagcagttc      960
aacagcacgt tccgtgtggt cagcgtcctc accgttgtgc accaggactg gctgaacggc     1020
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa ggcctcccag cctccatcga gaaaaccatc     1080
tccaaaacca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag     1140
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttggtca aaggcttcta cccagcgcac     1200
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacacctccc     1260
atgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg     1320
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac     1380
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa                                  1413

```

5 <210> 22
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1)

```

<400> 22
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 Ala Glu Val Lys Lys
20           25           30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35           40           45

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

```

ES 2 561 081 T3

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Asn Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val
 115 120 125
 Cys Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 130 135 140
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
 145 150 155 160
 Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 165 170 175
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 180 185 190
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 195 200 205
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln
 210 215 220
 Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 225 230 235 240
 Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 245 250 255
 Pro Pro Ala Ala Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 305 310 315 320

ES 2 561 081 T3

Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp
 325 330 335

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

Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 23
 <211> 378
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de ADN de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1)

10 <400> 23
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgcaactgggt ggcacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaaccctg acagtgggtg cacaaactat 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
 atggagctga acaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatcag 300
 ccctaggat attgtactaa tgggtgatgc tcctactttg actactgggg ccaggggaacc 360

ctggtcaccg tctcctca 378

15 <210> 24
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1)

ES 2 561 081 T3

<400> 24

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Asn Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr
100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 25

5 <211> 702

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de ADN de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1)

<400> 25

atgaggctcc ctgctcagct cctggggctc ctgctgctct ggttcccagg ttccagatgc 60
gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 120
atcaettgtc gggcgagtc gggatattac agctggtag cctggatatca gcagaaacca 180
gggaaagccc ctaacctcct gatctatact gcatccactt taaaagtgg ggtcccataca 240
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcaacct 300
gaagatthtg caacttacta ttgtcaacag gctaacattt tcccgtcac tttcggcgga 360
gggaccaagg tggagatcaa acgtacggtg gctgcacat ctgtttcat ctcccgcca 420
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggatg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgct gcgaagtcac ccatcagggc 660
15 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 702

<210> 26

<211> 234

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

ES 2 561 081 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1)

<400> 26

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

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

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

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

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

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

5 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

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

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

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 27

10 <211> 324

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia de ADN de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1)

ES 2 561 081 T3

<400> 27
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca gggatattac agctggtag cctgggatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaacctcct gatctatact gcatccactt tacaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcaacct 240
gaagatthtgc caacttacta ttgtcaacag gctaacattt tcccgtcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa acgt 324

5 <210> 28
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo IgG2-AAS(21.4.1)

<400> 28
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Tyr Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Thr Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ile Phe Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

15 <210> 29
<211> 978
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de ADN de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341)

ES 2 561 081 T3

<400> 29
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgcctt gctccaggag cacctccgag 60
agcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
tggaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cagctgtcct acagtcctca 180
ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc 240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 300
aatgttgtg tcgagtgcc accgtgccca gcaccacctg cagcagcacc gtcagtcttc 360
ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 420
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc 480
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt 540
gtggtcagcg tcctcacgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 600
aaggtctcca acaaaggcct cccagcctcc atcgagaaa ccatctcaa aaccaaggg 660
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 720
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg 780
gagagcaatg ggagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac 840
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 900
gtcttctcat gctccgtgat gcatgagget ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 960
tcctgtctc cgggtaaa 978

5

<210> 30
<211> 326
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-AAS(341)

ES 2 561 081 T3

<400> 30

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Pro Ala Ala Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190

ES 2 561 081 T3

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205

Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 31

<211> 978

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de ADN de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-S(341)

<400> 31

gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgcct gctccaggag cacctccgag	60
agcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgctg	120
tggaaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cagctgtcct acagtctca	180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcaacttggg caccagacc	240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc	300
aaatgttgtg tcgagtgccc accgtgcccc gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc	360
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc	420
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc	480

ES 2 561 081 T3

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt 540
 gtggtcagcg tcctcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 600
 aaggtctcca acaaaggcct cccagcctcc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaaggg 660
 cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggaggagat gaccaagaac 720
 caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaagge ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg 780
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac 840
 ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 900
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 960
 tccctgtctc cgggtaaa 978

<210> 32

<211> 326

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo IgG2-S(341)

<400> 32

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125

ES 2 561 081 T3

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205

Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 33
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

5

10

ES 2 561 081 T3

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270

ES 2 561 081 T3

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 34

<211> 326

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Thr Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160

10

ES 2 561 081 T3

Met Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

- <210> 35
- <211> 326
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 35
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

10

ES 2 561 081 T3

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

5 <210> 36
<211> 1616
<212> ADN

ES 2 561 081 T3

<213> Homo sapiens

<400> 36

```

gccaaggctg gggcagggga gtcagcagag gcctcgctcg ggcgcccagt ggtcctgccc      60
cctggtctca cctcgctatg gttcgtctgc ctctgcagtg cgtcctctgg ggctgcttgc      120
tgaccgctgt ccaccagaa ccaccactg catgcagaga aaaacagtac ctaataaaca      180
gtcagtgttg ttctttgtgc cagccaggac agaaactggg gactgactgc acagagttca      240
ctgaaacgga atgccttctt tggcgtgaaa gcgaattcct agacacctgg aacagagaga      300
cacactgcca ccagcacaaa tactgcgacc ccaacctagg gcttcggggtc cagcagaagg      360
gcacctcaga aacagacacc atctgcacct gtgaagaagg ctggcactgt acgagtgagg      420
cctgtgagag ctgtgtcctg caccgctcat gctcgcccgg ctttgggggtc aagcagattg      480
ctacaggggt ttctgatacc atctgcgagc cctgcccagt cggttcttc tccaatgtgt      540
catctgcttt cgaaaaatgt cacccttga caagctgtga gaccaaagac ctggttgtgc      600
aacaggcagg cacaaacaag actgatgttg tctgtgttcc ccaggatcgg ctgagagccc      660
tgggtgtgat ccccatcatc ttgggatcc tgtttgccat cctcttgggtg ctggtcttta      720
tcaaaaagggt ggccaagaag ccaaccaata aggccccca cccaagcag gaacccagg      780
agatcaattt tcccagcatc ctctctggct ccaacctgc tgctccagtg caggagactt      840
tacatggatg ccaaccggtc acccaggagg atggcaaaga gactcgcac tcagtgcagg      900
agagacagtg aggctgcacc caaccaggag tgtggccacg tgggcaaca ggcagttggc      960
cagagagcct ggtgctgctg ctgctgtggc gtgagggtga ggggctggca ctgactgggc     1020
atagctcccc gcttctgcct gcacccctgc agtttgagac aggagacctg gcaactggatg     1080
cagaaacagt tcacctgaa gaacctctca cttcaccctg gagcccatcc agtctcccaa     1140
cttgatttaa agacagaggc agaagtttgg tgggtgtggt gttggggtat ggtttagtaa     1200
tatccaccag accttccgat ccagcagttt ggtgccaga gaggcacatc ggtggcttcc     1260
ctgcgccag gaagccatat acacagatgc ccattgcagc attgtttgtg atagtgaaca     1320
actggaagct gcttaactgt ccatcagcag gagactggct aaataaaatt agaatatatt     1380
tatacaacag aatctcaaaa aactgttga gtaaggaaaa aaaggcatgc tgctgaatga     1440
tgggtatgga actttttaa aaagtacatg cttttatgta tgtatattgc ctatggatat     1500
atgtataaat acaatatgca tcatatattg atataacaag ggttctggaa ggttacacag     1560
aaaaccaca gctcgaagag tggtgacgtc tggggtgggg aagaagggtc tggggg      1616

```

5

<210> 37

<211> 277

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 37

Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
1 5 10 15

Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu
20 25 30

Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val
35 40 45

Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu
50 55 60

Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His
65 70 75 80

Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr
85 90 95

Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
100 105 110

Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
115 120 125

Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
130 135 140

Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
145 150 155 160

Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln
165 170 175

Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu
180 185 190

Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile
195 200 205

Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn
210 215 220

Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp
225 230 235 240

Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His
245 250 255

Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser
260 265 270

Val Gln Glu Arg Gln
275

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo monoclonal que comprende la región constante de cadena pesada representada por SEC ID n°:30, presenta una actividad agonista, y se une a CD40 humano, en el que el anticuerpo monoclonal comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por SEC ID n°: 6, 8 y 10, respectivamente, y la región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por SEC ID n°:16, 18 y 20, respectivamente.
- 10 2. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1,
 - (a) que comprende la región variable de cadena pesada representada por SEC ID n°:4, y la región variable de cadena ligera representada por SEC ID n°:14;
 - 15 o
 - (b) que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo producido por un hibridoma KM341-1-19 (FERM BP-7759), y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo producido por un hibridoma KM341-1-19 (FERM BP-7759).
- 20 3. ADN que codifica el anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
4. Vector recombinante que comprende el ADN según la reivindicación 3.
- 25 5. Transformante obtenible introduciendo el vector recombinante según la reivindicación 4 en una célula hospedadora.
6. Procedimiento para producir el anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende cultivar en un medio el transformante descrito en la reivindicación 5 para formar y acumular el anticuerpo monoclonal descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 en el cultivo y recuperar el anticuerpo monoclonal a partir del cultivo.
- 30 7. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, que comprende un polipéptido en el que se elimina una señal de secreción del polipéptido representado por SEC ID n°:2, y un polipéptido en el que se elimina una señal de secreción del polipéptido representado por SEC ID: 12.
- 35 8. Vector recombinante que comprende un ADN que codifica un polipéptido en el que se elimina una señal de secreción del polipéptido representado por SEC ID n°:2, y un ADN que codifica un polipéptido en el que se elimina una señal de secreción del polipéptido representado por SEC ID n°:12.
- 40 9. Transformante obtenible introduciendo el vector recombinante según la reivindicación 8 en una célula hospedadora.
10. Procedimiento para producir el anticuerpo monoclonal según la reivindicación 7, que comprende cultivar en un medio el transformante descrito en la reivindicación 9 para formar y acumular el anticuerpo monoclonal descrito en la reivindicación 7 en el cultivo y obtener así el anticuerpo monoclonal a partir del cultivo.
- 45 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 10, en el que el procedimiento comprende además purificar el anticuerpo monoclonal.
- 50 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6, 10 u 11, en el que el procedimiento comprende además proporcionar el anticuerpo monoclonal en una preparación farmacéutica.
13. Anticuerpo monoclonal, que es obtenible mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 y 10-12.
- 55 14. Utilización del anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 y 7, para la preparación de un agente terapéutico para tumores malignos o infecciones.
- 60 15. Anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 y 7, para la utilización en el tratamiento de tumores malignos o infecciones.

Fig. 1A

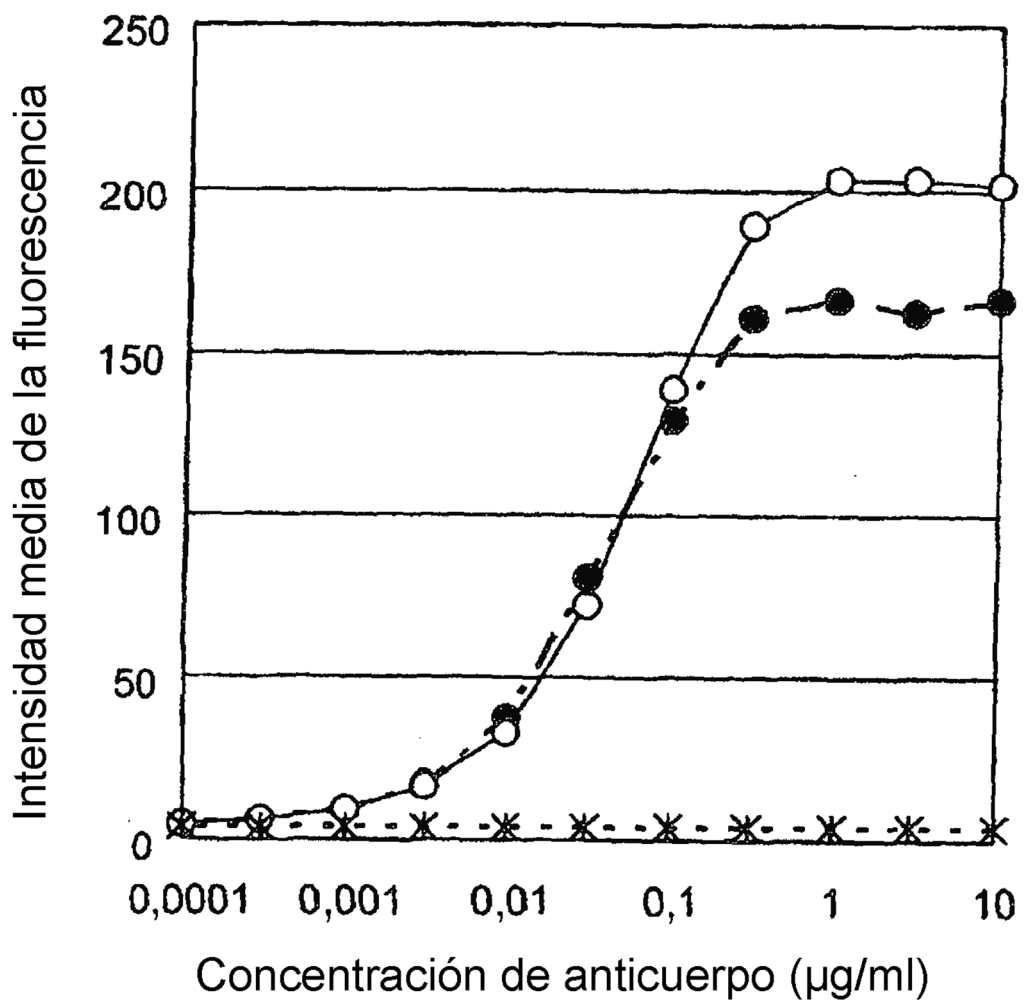


Fig. 1B

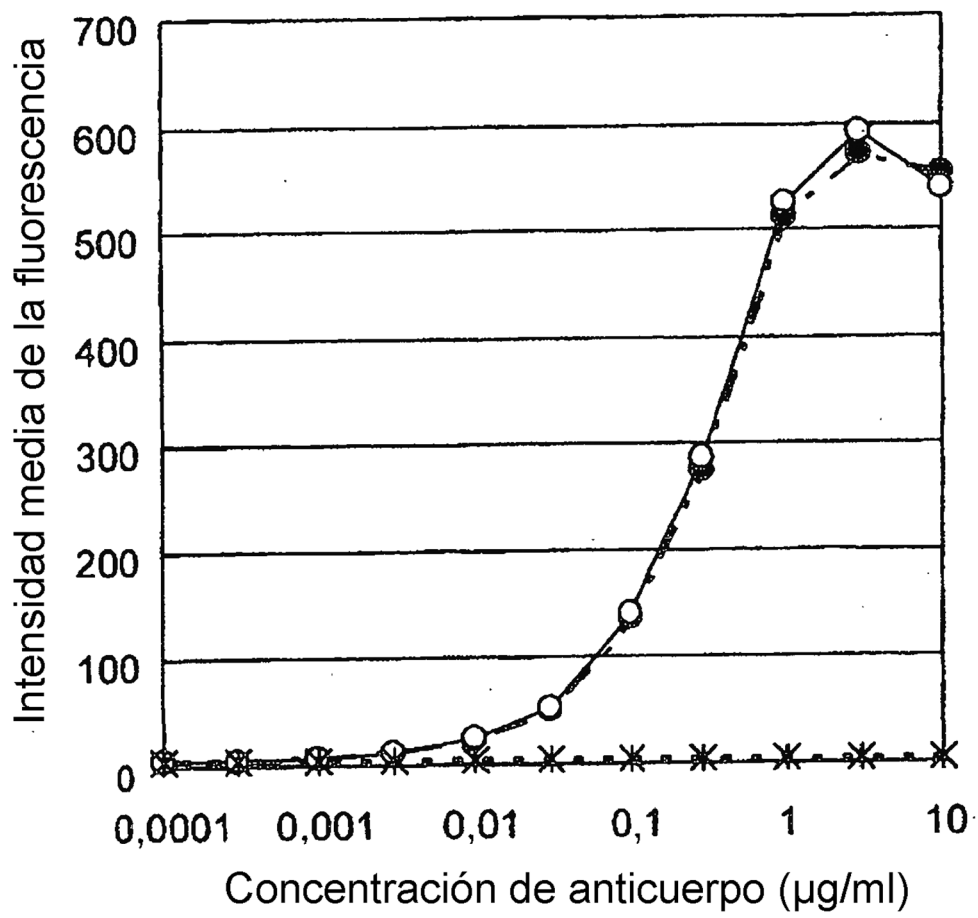


Fig. 2A

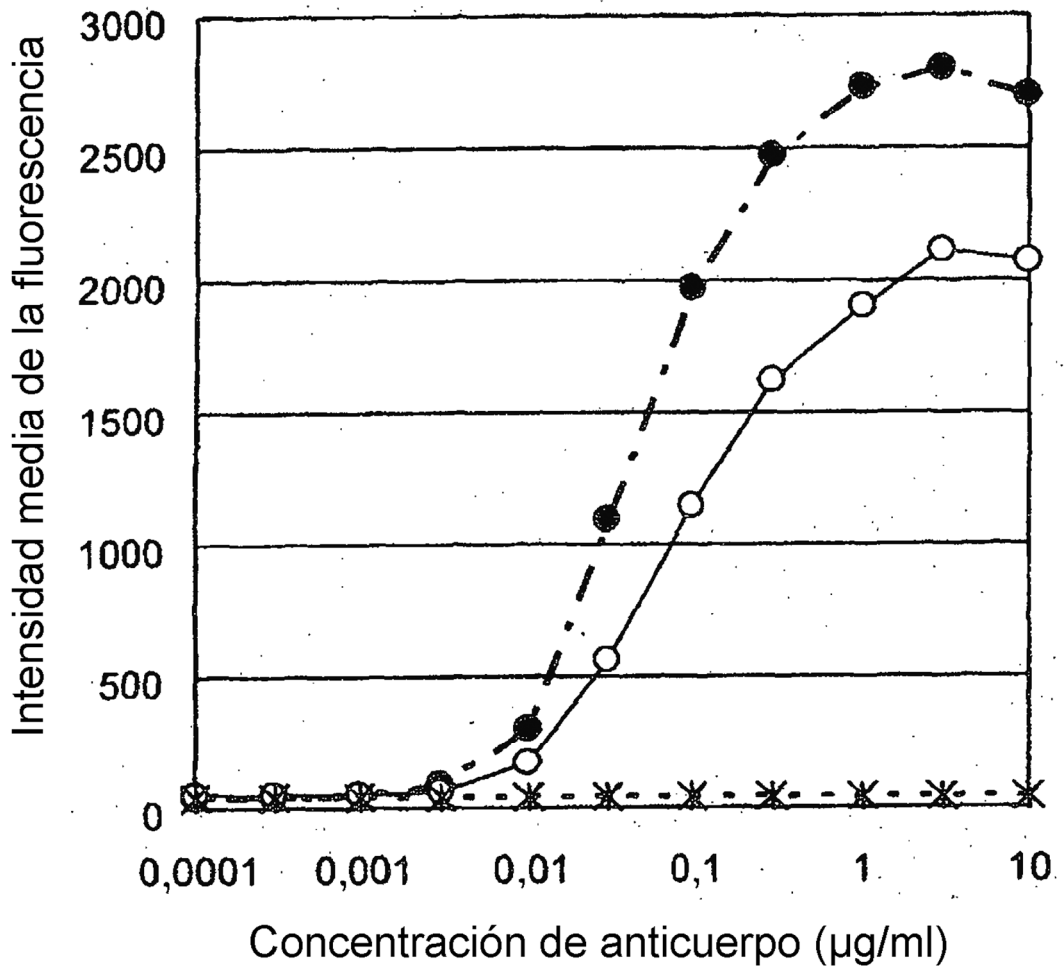


Fig. 2B

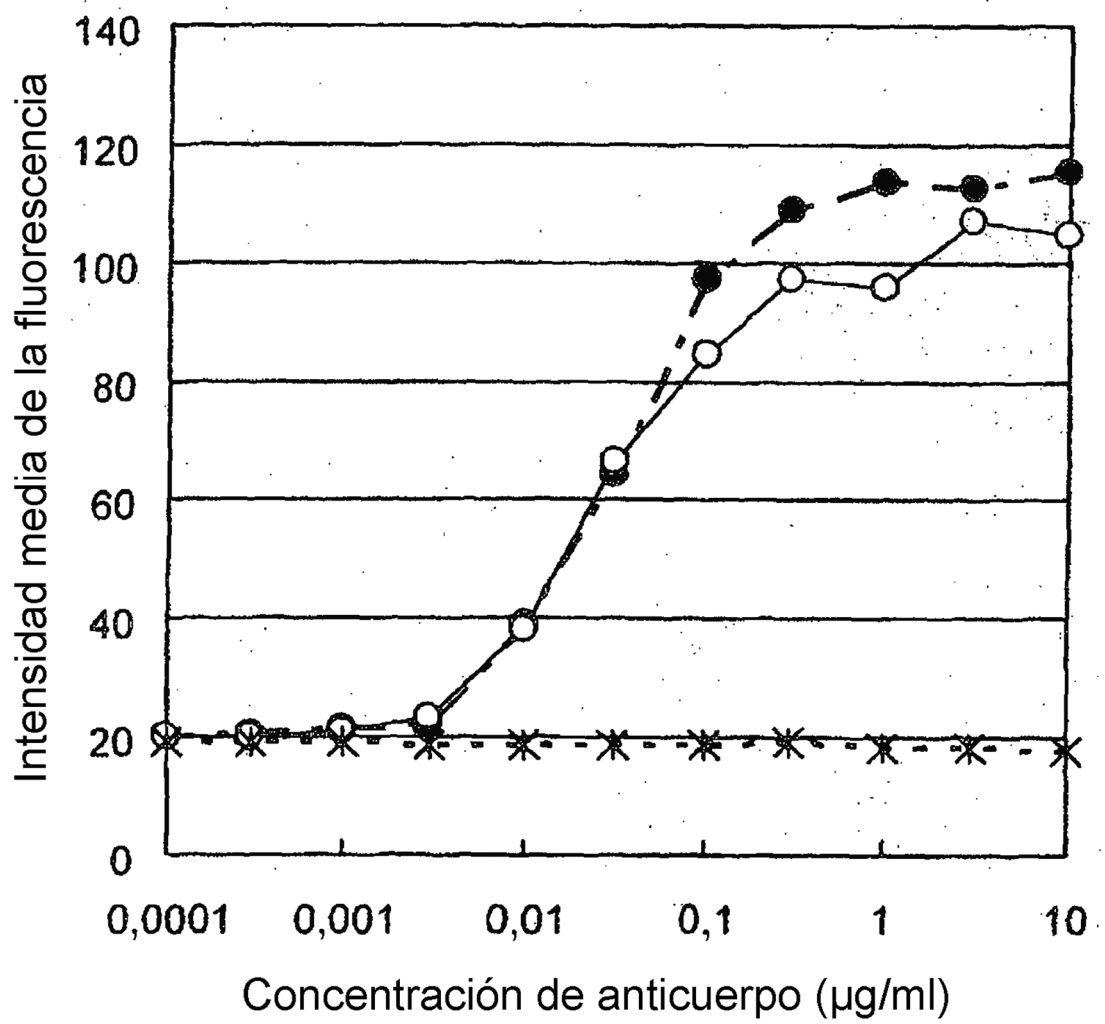


Fig. 3

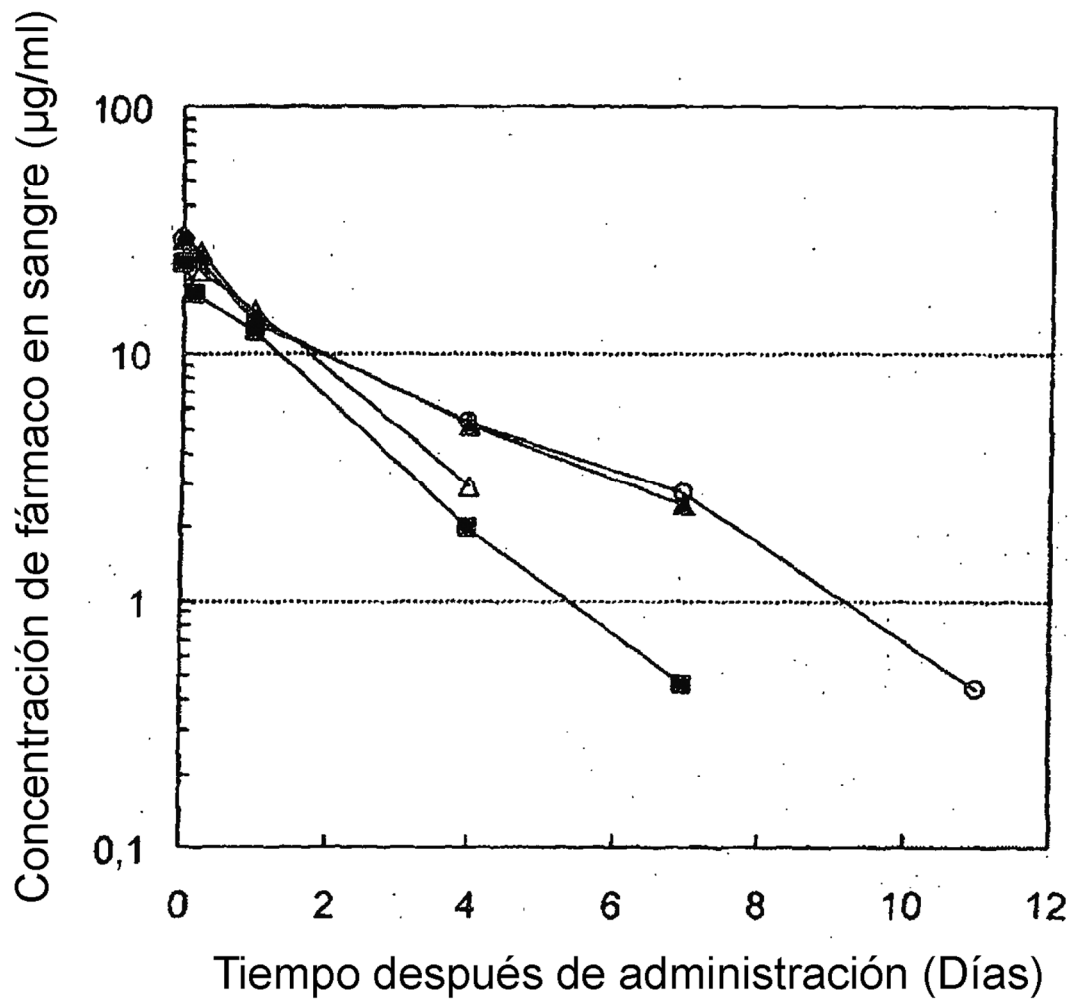


Fig. 4A

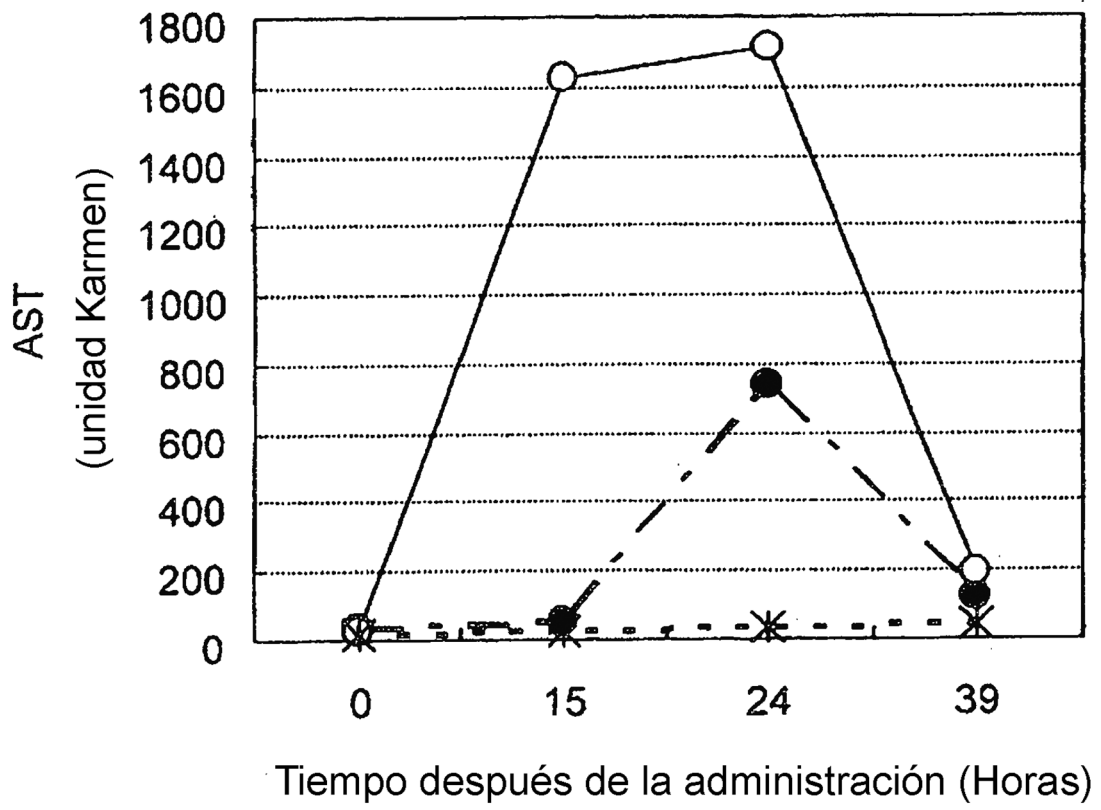


Fig. 4B

