

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 817**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.11.2011 PCT/EP2011/070058**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2012 WO12065950**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2011 E 11781571 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2640749**

54 Título: **Variantes de Fc silenciosas de los anticuerpos anti-CD40**

30 Prioridad:

15.11.2010 US 413567 P

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

25.09.2017

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**HEUSSER, CHRISTOPH;
RUSH, JAMES y
VINCENT, KAREN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 633 817 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

Variantes de Fc silenciosas de los anticuerpos anti-CD40

La presente divulgación se refiere a variantes de un fragmento constante (Fc) silenciosas de anticuerpos anti-CD40, y a composiciones y métodos de uso de estos anticuerpos, para el tratamiento de trastornos patológicos, tales como trastornos autoinmunes e inflamatorios, y/o para prevenir o reducir el riesgo de rechazo de injerto en el trasplante. A pesar de la disponibilidad de varios tratamientos inmunosupresores para las enfermedades autoinmunes, sigue existiendo una gran necesidad insatisfecha de fármacos más eficaces y más seguros en una gran fracción de la población de pacientes. Por ejemplo, a pesar de la eficacia reportada de las terapias consumidoras/inhedoras de las células B, como Rituximab y Belimumab en artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, y esclerosis múltiple, estas terapias son solamente efectivas en una porción de los individuos enfermos, y, con el Rituximab, con un riesgo aunado de leucoencefalopatía multifocal progresiva. Además, con frecuencia están involucrados otros múltiples tipos de células de leucocitos en la patología de estas enfermedades autoinmunes, tales como macrófagos, células dendríticas y células T; por consiguiente, la intervención terapéutica que se dirija a tipos de células adicionales o a sendas inmunológicas clave que inhiban su función, podría proporcionar un beneficio. Dadas las múltiples funciones inmunológicamente relevantes del CD40-CD154 en la activación y función de estos tipos de células, es probable que un anticuerpo anti-CD40 conferiría un beneficio terapéutico a los pacientes que padezcan las enfermedades autoinmunes ilustradas anteriormente más allá de lo que proporcionan en el presente las terapias actuales. Además, la función central de las interacciones de CD40-CD154 en los trastornos inflamatorios intestinales, tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa, y las vinculaciones mecánicas de la senda de CD40 con la patología en trastornos más raros, tales como vasculitis autoinmune, pénfigo vulgar, e ITP, también realzan el potencial de los anticuerpos anti-CD40 en estas indicaciones.

Los inmunosupresores actualmente disponibles utilizados después del trasplante de un órgano sólido, proporcionan una excelente eficacia a corto plazo. Se observan rechazos agudos dentro del período *de novo* en el 5 % al 20 % de los receptores (dependiendo del órgano, de la población de pacientes, y del régimen), y la proporción de injertos perdidos por el rechazo agudo dentro del período *de novo* está por debajo del 5 % para cualquier establecimiento. Actualmente, la necesidad insatisfecha clave es la tolerabilidad de la inmunosupresión con el paciente y la sobrevivencia del injerto a largo plazo. Después del trasplante renal, el 33 % de los pacientes mueren y/o pierden su injerto dentro de 5 años; la edad promedio de muerte del receptor del trasplante es de 58 años. Los inhibidores de calcineurina (CNI) siguen siendo el fundamento de la terapia inmunosupresora para la gran mayoría de los pacientes de trasplante. Aunque la nefrotoxicidad y la patología cardiovascular asociada con los inhibidores de calcineurina (CNIs) es uno de los impulsores de la nefropatía de aloinjerto crónica, así como la muerte del paciente con un injerto funcionando, la inmunosupresión primaria alternativa no ha podido reemplazar a los inhibidores de calcineurina (CNIs). Sobre todo, hay todavía espacio para hacer mejoras en la inmunosupresión de trasplantes a largo plazo. El daño inmunológico mediado por las células B de los riñones trasplantados puede contribuir a pobres resultados a largo plazo, y la comunidad médica está reconociendo cada vez más la necesidad de nuevos agentes para resolver el rechazo de las células B.

Chir12.12 es un anticuerpo anti-CD40 no agonista completamente humanizado (IgG1, kappa) que bloquea la activación de los leucocitos mediada por el CD154 (también conocido como ligando CD40; CD40L), y puede mediar la citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos (ADCC) de los leucocitos humanos y los linfomas de células B *in vitro* (véase la Publicación Internacional Número WO2006/073443). La Publicación Internacional Número WO2005/044306 también describe anticuerpos antagonistas anti-CD40, incluyendo Chir12.12, para utilizarse en particular en el tratamiento de los trastornos autoinmunes e inflamatorios. Además, Chir12.12 es efectivo para retrasar el rechazo de aloinjerto de riñón cuando se dosifica como una monoterapia en *Macaca fascicularis* (monos cinomolgos) [Li y colaboradores (2008) *Transplantation*; 86 (1): 10-15]. Sin embargo, Chir12.12 también puede mediar el consumo de las células B periféricas en los primates no humanos (NHPs).

Se predice que los mAbs anti-CD40 con actividad de citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos ADCC silenciada, tienen un perfil de seguridad mejorado en relación con los anticuerpos anti-CD40 progenitores, y en particular, pueden ser más adecuados para las indicaciones no oncológicas, tales como las enfermedades autoinmunes, y para su uso en una situación de trasplante.

La presente divulgación, por consiguiente, proporciona anticuerpos monoclonales anti-CD40 silenciosos Fc que conservan los atributos bloqueadores del CD40L no agonistas del anticuerpo anti-CD40 progenitor Chir12.12.

En particular, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado o una proteína que comprende una porción de enlace de antígeno de un anticuerpo dirigida contra el polipéptido de CD40 objetivo (SEQ ID NO: 28), caracterizado porque este anticuerpo o esta proteína:

- a) se enlaza al polipéptido de CD40 con una KD de 10 nM o menos, y
- b) comprende una región Fc de IgG silenciosa.

En una realización, este anticuerpo o esta proteína inhibe la señalización inducida por CD40L con una IC₅₀ de 50 nanogramos/mililitro o menos.

En otra realización, el anticuerpo aislado o la proteína de acuerdo con la invención no tiene ninguna actividad agonista, o tiene una baja actividad agonista con respecto a la señalización de CD40.

5 En otra realización, el anticuerpo o la proteína de acuerdo con la presente divulgación comprende una región Fc de IgG silenciosa seleccionada a partir del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19.

En otra realización, el anticuerpo aislado o la proteína de la divulgación comprende regiones variables de cadena pesada (V_H) y de cadena ligera (V_L) que tienen al menos el 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de identidad de secuencia con la V_H del anticuerpo Chir12.12 (SEQ ID NO: 9), y con la V_L del anticuerpo Chir12.12 (SEQ ID NO: 10), respectivamente.

10 Un ejemplo específico del anticuerpo de acuerdo con la invención es:

- mAb1, el cual comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 11 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 12,

15 El anticuerpo aislado de acuerdo con la invención se puede utilizar como un medicamento. En particular, son adecuados para utilizarse en el tratamiento de trastornos autoinmunes, trastornos inflamatorios, y/o en la prevención o reducción del riesgo de rechazo de injerto en el trasplante.

El anticuerpo aislado de acuerdo con la invención se puede utilizar en particular en el tratamiento de esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide, rechazo de trasplante, y la enfermedad del injerto contra el huésped.

20 La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos anteriores de acuerdo con la invención, en combinación con al menos un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones farmacéuticas pueden comprender adicionalmente otros ingredientes activos.

La invención también se refiere a una formulación líquida de un anticuerpo de acuerdo con la invención.

25 La invención se refiere además al ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo o la proteína de acuerdo con la invención, y al vector de clonación o de expresión correspondiente, el cual comprende los ácidos nucleicos de SEQ ID NOs: 22 y 23.

La invención también se refiere a una célula huésped, la cual comprende uno o más vectores de clonación o de expresión como se definen anteriormente.

30 La invención proporciona además un proceso para la producción de un anticuerpo de la invención, el cual comprende cultivar la célula huésped como se define anteriormente, purificar y recuperar este anticuerpo o esta proteína.

Con el objeto de que la presente invención se pueda entender más fácilmente, primero se definen ciertos términos. Se estipulan definiciones adicionales a través de toda la descripción detallada.

35 El término "respuesta inmunitaria" se refiere a la acción de, por ejemplo, los linfocitos, las células presentadoras de antígeno, las células fagocíticas, los granulocitos, y las macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o por el hígado (incluyendo los anticuerpos, las citoquinas, y el complemento), dando como resultado un daño selectivo a, destrucción de, o eliminación en el cuerpo humano, de patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas, o, en los casos de autoinmunidad o de inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

40 Una "senda de transducción de señales" o "actividad de señalización" se refiere a una relación causal bioquímica iniciada en términos generales por una interacción de proteína-proteína, tal como el enlace de un factor de crecimiento a un receptor, que da como resultado la transmisión de una señal a partir de una porción de una célula hasta otra porción de una célula. En general, la transmisión involucra la fosforilación específica de uno o más residuos de tirosina, serina, o treonina sobre una o más proteínas en la serie de reacciones que causa la transducción de señales. Los penúltimos procesos típicamente incluyen eventos nucleares que dan como resultado un cambio en la expresión genética.

45 El término CD40 se refiere al CD40 humano, por ejemplo, como se define en la SEQ ID NO: 28, a menos que se describa de otra manera.

El término "anticuerpo", como es referido en la presente, incluye los anticuerpos enteros y cualesquiera fragmentos de enlace de antígeno (es decir, "porción de enlace de antígeno"), o las cadenas individuales de los mismos.

50 Un "anticuerpo" que se presenta naturalmente es una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces de disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta de una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como V_H) y una región constante de cadena

pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta de una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta de un dominio, C_L. Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas como regiones determinantes de complementariedad (CDRs), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas como regiones de estructura (FRs). Cada V_H y V_L está compuesta de tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs) y cuatro regiones de estructura (FRs) acomodadas desde el término amino hasta el término carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de enlace que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar el enlace de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluyendo distintas células del sistema inmunológico (por ejemplo, las células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema clásico de complementos.

El término "porción de enlace de antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de antígeno"), como se utiliza en la presente, se refiere a un anticuerpo de longitud completa, o a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad para enlazarse específicamente a un antígeno (por ejemplo, una porción de CD40). Se ha mostrado que la función de enlace de antígeno de un anticuerpo se puede llevar a cabo mediante los fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de los fragmentos de enlace abarcados dentro del término de "porción de enlace de antígeno" de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L, V_H, C_L y CH1; un fragmento F(ab)₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente de disulfuro en la región de articulación; un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo; un fragmento dAb (Ward y colaboradores, 1989, Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio V_H; y una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, o cualesquiera proteínas de fusión que comprendan esta porción de enlace de antígeno.

Adicionalmente, aunque los dos dominios del fragmento Fv, el V_L y el V_H, son codificados por genes separados, se pueden unir, empleando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite hacerse como una proteína de una sola cadena, en la cual las regiones V_L y V_H forman pares para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de una sola cadena (scFv)); véase también Bird y colaboradores, 1988, Science 242: 423-426; y Huston y colaboradores, 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 5879-5883). Estos anticuerpos de una sola cadena también pretenden estar abarcados dentro del término "porción de enlace de antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen empleando las técnicas convencionales conocidas para los expertos en este campo, y los fragmentos son seleccionados por su utilidad de la misma manera que lo son los anticuerpos intactos.

Como se utiliza en la presente, el término "región Fc de IgG" se utiliza para definir la región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo la región Fc de la secuencia nativa y las regiones Fc variantes. La región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define en general como aquella que comprende el residuo de aminoácido a partir de la posición C226 o a partir de P230 hasta el término carboxilo del anticuerpo de IgG. La numeración de los residuos en la región Fc es aquella del índice EU de Kabat. La lisina C-terminal (residuo K447) de la región Fc se puede remover, por ejemplo, durante producción o purificación del anticuerpo. De conformidad con lo anterior, una composición de los anticuerpos de la invención puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los residuos K447 eliminados, poblaciones de anticuerpos in residuos K447 eliminados, y poblaciones de anticuerpos que tengan una mezcla de los anticuerpos con y sin el residuo K447.

Un "anticuerpo aislado", como se utiliza en la presente, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se enlaza específicamente al CD40 está sustancialmente libre de anticuerpos que se enlacen específicamente a antígenos distintos del CD40). Un anticuerpo aislado que se enlaza específicamente al CD40, sin embargo, tiene reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de CD40 de otras especies (no humanas). Más aún, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se utilizan en la presente, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpos de una sola composición molecular. Una composición de anticuerpo monoclonal exhibe una sola especificidad de enlace y afinidad por un epítipo particular.

El término "anticuerpo humanizado", como se utiliza en la presente, pretende incluir los anticuerpos que contienen una secuencia mínima derivada a partir de las secuencias de inmunoglobulina no humanas. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor), en donde los residuos a partir de una región hipervariable (también conocida como región determinante de complementariedad o CDR) del receptor son reemplazados por residuos a partir de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador), tal como ratón, rata, conejo, o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. La expresión "región determinante de complementariedad" se refiere a las secuencias de aminoácidos que definen juntas la afinidad y especificidad de enlace de la región Fv natural de un sitio de enlace de inmunoglobulina nativo. Véase, por ejemplo, Chotia y colaboradores (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917; Kabat y colaboradores (1991) US Dept. of Health and Human Services (Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos), NIH Publicación No. 91-3242). La expresión "región constante" se refiere a la porción de la molécula de anticuerpo que confiere las funciones efectoras. En el trabajo anterior, que se refiere a la producción de anticuerpos no

5 inmunogénicos para utilizarse en la terapia de las enfermedades humanas, las regiones constantes de ratón fueron sustituidas por regiones constantes humanas. Las regiones constantes de los presentes anticuerpos humanizados se derivaron a partir de las inmunoglobulinas humanas. La humanización se puede llevar a cabo siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones y colaboradores (1986) Nature 321: 522-525; Riechmann y colaboradores (1988) Nature 332: 323-327; Verhoeven y colaboradores (1988) Science 239: 1534-1536), mediante la sustitución de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) o de las secuencias de regiones determinantes de complementariedad (CDR) de roedor y de roedor mutante, por las secuencias correspondientes del anticuerpo humano. En algunas instancias, los residuos dentro de las regiones de estructura de una o más regiones variables de la inmunoglobulina humana son reemplazados por los residuos no humanos correspondientes (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; y 6,180,370). Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentren en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. El anticuerpo humanizado de la invención también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc). Típicamente, aquella de una inmunoglobulina humana, y en el presente caso, una región Fc de IgG silenciosa.

15 Los anticuerpos de la divulgación pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por las secuencias humanas (por ejemplo, las mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). En particular, el término "anticuerpo humanizado" incluye los anticuerpos que comprenden una variante silenciosa de la región Fc de IgG.

20 El término "anticuerpo monoclonal humanizado" se refiere a los anticuerpos que exhiben una sola especificidad de enlace, los cuales tienen regiones variables, en donde las regiones variables se humanizan a partir de las secuencias no humanas.

25 El término "anticuerpo recombinante", como se utiliza en la presente, incluye todos los anticuerpos humanos o humanizados que son preparados, expresados, creados o aislados por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados a partir de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para los genes de inmunoglobulina humana, o un hibridoma preparado a partir de los mismos, anticuerpos aislados a partir de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano o humanizado, por ejemplo, de un transfectoma, anticuerpos aislados a partir de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatorios, recombinantes, y anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique separar toda o una porción de un gen de inmunoglobulina humana, secuencias para otras secuencias de ADN. Estos anticuerpos humanos o humanizados recombinantes tienen regiones variables en las cuales las regiones de estructura y las regiones determinantes de complementariedad (CDR) se pueden derivar a partir de las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, estos anticuerpos humanos o humanizados recombinantes se pueden someter a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para las secuencias de la Ig humana, a mutagénesis somática *in vivo*), y de este modo, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan a partir de, y se relacionan con, las secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana, pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

35 Como se utiliza en la presente, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM, IgE, IgG, tales como IgG1 o IgG4) que es proporcionado por los genes de región constante de cadena pesada. Diferentes isotipos tienen diferentes funciones efectoras. Por ejemplo, Los isotipos IgG1 e IgG3 humanos de tipo silvestre median la actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC).

40 Las expresiones "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" y "un anticuerpo dirigido contra un antígeno", se utilizan indistintamente en la presente con el término "un anticuerpo que se enlaza específicamente a un antígeno".

45 Como se utiliza en la presente, un anticuerpo o una proteína que "se enlaza específicamente al polipéptido de CD40" pretende referirse a un anticuerpo o una proteína que se enlaza al polipéptido de CD40 humano con una K_D de 100 nM o menos, de 10 nM o menos, o de 1 nM o menos.

50 Un anticuerpo que "tiene reacción cruzada con un antígeno distinto del CD40" pretende referirse a un anticuerpo que se enlaza a este antígeno con una K_D de 1 μ M o menor, de 100 nM o menor, de 10 nM o menor, o de 1 nM o menor. Un anticuerpo que "no tiene reacción cruzada con un antígeno particular" pretende referirse a un anticuerpo que se enlaza a ese antígeno, con una K_D de 100 nM o mayor, o con una K_D de 1 μ M o mayor, o una K_D de 10 μ M o mayor. En ciertas realizaciones, estos anticuerpos que no tienen reacción cruzada con el antígeno exhiben un enlace esencialmente indetectable contra estas proteínas en los ensayos de enlace convencionales.

55 El término " K_{asoc} " o " K_a ", como se utiliza en la presente, pretende referirse al índice de asociación de una interacción particular de anticuerpo-antígeno, mientras que el término " K_{dis} " o " K_d ", como se utiliza en la presente, pretende referirse al índice de disociación de una interacción particular de anticuerpo-antígeno.

El término " K_b ", como se utiliza en la presente, pretende referirse a la constante de disociación, la cual se obtiene a partir de la proporción de K_d a K_a (es decir, K_d/K_a), y se expresa como una concentración molar (M). Los valores K_D

para los anticuerpos se pueden determinar empleando los métodos bien establecidos en este campo. Un método para determinar la K_D de un anticuerpo es utilizando resonancia de plasmón superficial, o utilizando un sistema biosensor, tal como un sistema Biacore®.

5 Como se utiliza en la presente, el término "Afinidad" se refiere a la fuerza de interacción entre el anticuerpo y el antígeno en los sitios antigénicos individuales. Dentro de cada sitio antigénico, la región variable del "brazo" del anticuerpo interactúa a través de fuerzas no covalentes débiles con el antígeno en numerosos sitios; mientras más interacciones haya, más fuerte será la afinidad.

10 Como se utiliza en la presente, el término "Aidez" se refiere a una medida de información de la estabilidad o fuerza global del complejo de anticuerpo-antígeno. Se controla mediante tres factores principales: la afinidad del epítipo del anticuerpo; la valencia de tanto el antígeno como del anticuerpo; y la configuración estructural de las partes que interactúan. Por último estos factores definen la especificidad del anticuerpo, es decir, la probabilidad de que el anticuerpo particular se enlace al epítipo preciso del antígeno.

15 Como se utiliza en la presente, el término "antagonista de CD40" pretende referirse a un anticuerpo o a una proteína que inhibe la actividad de señalización inducida por CD40 en la presencia del CD40L en un ensayo de células humanas, tal como el ensayo de PBMC mediada por el CD40L. Este ensayo se describe con mayor detalle en los Ejemplos más adelante. En algunas realizaciones, los anticuerpos o las proteínas de la invención inhiben la señalización inducida por CD40L con una IC_{50} de 500 nanogramos/mililitro o menos, de preferencia con una IC_{50} de 50 nanogramos/mililitro o menos, por ejemplo, con una IC_{50} de 20 nanogramos/mililitro o menos, como se mide en el ensayo de proliferación de PBMC mediada por el CD40L.

20 Como se utiliza en la presente, un anticuerpo con "ninguna actividad agonista" pretende referirse a un anticuerpo que no aumenta de una manera significativa la actividad de señalización mediada por CD40 en ausencia del CD40L en un ensayo basado en células, tal como el ensayo de proliferación de PBMC mediada por el CD40L. Este ensayo se describe con más detalles en los Ejemplos más adelante.

25 Como se utiliza en la presente, el término "ADCC" o actividad de "citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos" se refiere a la actividad de consumo de células. La actividad de ADCC se puede medir mediante el ensayo de ADCC como se describe con más detalles en los Ejemplos más adelante.

Como se utiliza en la presente, el término anticuerpo "silencioso" se refiere a un anticuerpo que no exhibe ninguna actividad, o que exhibe una baja actividad de ADCC, como se mide en un ensayo de ADCC como se describe en los Ejemplos.

30 En una realización, el término "ninguna o baja actividad de ADCC" significa que el anticuerpo silencioso exhibe una actividad de ADCC que está por debajo del 50 % de lisis celular específica, por ejemplo, por debajo del 10 % de lisis celular específica, como se mide en el ensayo de citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos (ADCC), como se describe en los Ejemplos. Ninguna actividad de ADCC significa que el anticuerpo silencioso exhibe una actividad de ADCC (lisis celular específica) que está debajo del 1 %. En una realización, específica, un anticuerpo silencioso de acuerdo con la invención no exhibe ninguna actividad significativa de ADCC, como se mide en un ensayo de ADCC como se describe en los Ejemplos.

35 Las funciones efectoras silenciadas se pueden obtener mediante una mutación en la región Fc de los anticuerpos, y se han descrito en la técnica: LALA y N297A (Strohl, W., 2009, Curr. Opin. Biotechnol. Volumen 20(6): 685-691); y D265A (Baudino y colaboradores, 2008, J. Immunol. 181: 6664-69; Strohl, W., *supra*). Los ejemplos de los anticuerpos Fc de IgG1 silenciosos comprenden los denominados como LALA mutante, el cual comprende las mutaciones L234A y L235A en la secuencia de aminoácidos de Fc de IgG1. Otro ejemplo de un anticuerpo de IgG1 silencioso comprende la mutación D265A. Otro anticuerpo de IgG1 silencioso comprende la mutación N297A, la cual da como resultado anticuerpos aglicosilados/no glicosilados.

45 Como se utiliza en la presente, el término "selectividad" para un anticuerpo o una proteína de la divulgación, se refiere a un anticuerpo o a una proteína que se enlaza a cierto polipéptido objetivo pero no a los polipéptidos estrechamente relacionados.

Como se utiliza en la presente, el término "alta afinidad" por un anticuerpo, se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 1 nM o menos para un antígeno objetivo. Como se utiliza en la presente, el término "sujeto" incluye a cualquier animal humano o no humano.

50 El término "animal no humano" incluye a todos los vertebrados, por ejemplo mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

55 Como se utiliza en la presente, el término "optimizada", significa que una secuencia de nucleótidos se ha alterado para codificar una secuencia de aminoácidos que utiliza codones que son preferidos en la célula u organismo de producción, en general una célula eucariótica, por ejemplo una célula de *Pichia*, una célula de *Trichoderma*, una célula de ovario de hámster chino (CHO), o una célula humana. La secuencia de nucleótidos optimizada se diseña para retener completamente, o tanto como sea posible, la secuencia de aminoácidos originalmente codificada por la

secuencia de nucleótidos inicial, la cual también se conoce como la secuencia "progenitora". Las secuencias optimizadas de la presente se han diseñado para tener codones que son preferidos en las células de mamífero de ovario de hámster chino; sin embargo, también se prevé en la presente la expresión optimizada de estas secuencias en otras células eucarióticas. Las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de nucleótidos optimizadas también son referidas como optimizadas.

Como se utiliza en la presente, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, el porcentaje de identidad = # de posiciones idénticas/# total de posiciones x 100), tomando en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que se necesiten introducir para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias, se pueden llevar a cabo utilizando un algoritmo matemático, como se describe más adelante.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17, 1988), el cual se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos ponderados PAM120, una multa por longitud de hueco de 12, y una multa por hueco de 4. De una manera alternativa, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 444-453, 1970), el cual se ha incorporado en el programa Gap en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), utilizando ya sea una matriz Blossom 62 o bien una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos de nucleótidos también se puede determinar utilizando, por ejemplo, algoritmos tales como el programa BLASTN para secuencias de ácidos nucleicos, utilizando por omisión, una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = 4, y una comparación de ambas cadenas.

Anticuerpos recombinantes

Los anticuerpos de la divulgación incluyen los anticuerpos recombinantes humanizados mAb1-mAb3, aislados y estructuralmente caracterizados by sus secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera de longitud completa, como se describen en la siguiente Tabla 1:

Tabla 1

Secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera de longitud completa de los mAb1-mAb3

Anticuerpo	Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de longitud completa	Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de longitud completa
mAb1	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
mAb2	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14
mAb3	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16

Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables correspondientes V_H y V_L de los anticuerpos aislados mAb1-mAb3 de la divulgación, se derivan todas a partir del mismo anticuerpo Chir12.12 anteriormente descrito, por ejemplo, en la Publicación Internacional Número WO2006/073443, y que consiste en la secuencia de aminoácidos V_H de la SEQ ID NO: 7, y la secuencia de aminoácidos V_L de la SEQ ID NO: 8.

Una diferencia importante de los anticuerpos de la divulgación, comparándose con el CHIR12.12 original, es que tienen una región Fc, la cual consiste en una región Fc de IgG silenciosa, por ejemplo, la región Fc de IgG1 silenciosa.

En particular, la Tabla 2 resume la modificación de la región Fc de IgG1 realizada para obtener los anticuerpos mAb1-mAb3, comparándose con el anticuerpo CHIR12.12 original.

Tabla 2

Modificación de la región Fc de IgG1 para obtener los mAb1-mAb3

Anticuerpo	Modificación de la región Fc de IgG1	Secuencia de aminoácidos de la región Fc
mAb1	N297A	SEQ ID NO: 17
mAb2	D265A	SEQ ID NO: 18
mAb3	L234A/L235A	SEQ ID NO: 19

5 Otros anticuerpos de la divulgación incluyen aquéllos que tienen aminoácidos que se han mutado mediante supresión, inserción o sustitución de aminoácidos, y no obstante, tienen al menos el 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de identidad con las regiones V_H y V_L de Chir12.12, respectivamente, las SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, y que comprenden una región Fc de IgG silenciosa, por ejemplo, una región Fc de IgG1 silenciosa.

10 En algunas realizaciones, el anticuerpo de la divulgación es una variante mutante de cualquiera de los mAb1-mAb3, en donde el anticuerpo variante mutante incluye secuencias de aminoácidos mutantes, en donde no más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos se han mutado mediante supresión, inserción o sustitución de aminoácidos en las regiones V_H y V_L, cuando se comparan con las regiones V_H y V_L de Chir12.12, respectivamente, las SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, y que conservan las mismas regiones constantes que mAb1, mAb2 o mAb3.

Las secuencias de codificación de nucleótidos de cadena ligera y pesada de longitud completa de los mAb1-mAb3 se muestran en la siguiente Tabla 3.

15

Tabla 3

Secuencias de codificación de ADN de cadena pesada y ligera de longitud completa

Anticuerpo	Secuencia de codificación de ADN de cadena pesada de longitud completa	Secuencia de codificación de ADN de cadena ligera de longitud completa
mAb1	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23
mAb2	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25
mAb3	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27

20 Otros ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la divulgación incluyen los ácidos nucleicos que se han mutado mediante supresión, inserción o sustitución de nucleótidos, y no obstante, tienen al menos el 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de identidad con las regiones codificantes correspondientes V_H y V_L de Chir12.12, como se ilustran en las secuencias descritas, por ejemplo, en las SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21, respectivamente, y que comprenden una secuencia de codificación de una región Fc de IgG silenciosa, por ejemplo, una región Fc de IgG1 silenciosa.

25 En algunas realizaciones, incluye ácidos nucleicos variantes, en donde no más de 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos han sido cambiados mediante supresión, inserción o sustitución de nucleótidos in las regiones codificantes V_H y V_L con las regiones codificantes V_H y V_L ilustradas en las secuencias descritas, por ejemplo, en las SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21, respectivamente, y que conservan las mismas secuencias de codificación de las regiones constantes que las secuencias de codificación correspondientes de los mAb1, mAb2 o mAb3.

Anticuerpos homólogos

En adición a los anticuerpos recombinantes de la divulgación, mAb1-mAb3, la invención también abarca anticuerpos o proteínas homólogas que conservan las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos mAb1-mAb3.

5 En particular, los anticuerpos o las proteínas homólogas de acuerdo con la divulgación son los anticuerpos o las proteínas que comprenden una porción de enlace de antígeno de un anticuerpo dirigido contra un polipéptido de CD40 objetivo (SEQ ID NO: 28), caracterizados porque este anticuerpo o esta proteína:

a) se enlaza al polipéptido de CD40 con una KD de 10 nM o menos, y

b) comprende una región Fc de IgG silenciosa,

10 y en donde los anticuerpos o las proteínas homólogas conservan las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos mAb1-mAb3 originales.

Las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos mAb1-mAb3 originales se pueden seleccionar a partir de una o más de las siguientes propiedades:

(i) se enlaza específicamente al CD40, por ejemplo, con una KD que es de 100 nM o menos, de 10 nM o menos, o de 1 nM o menos, como se mide en el ensayo Biacore;

15 (ii) es un antagonista de CD40, por ejemplo, inhibe la señalización inducida por CD40L, como se mide en el ensayo de PBMC mediada por el CD40L;

(iii) no exhibe ninguna actividad agonista o exhibe una baja actividad agonista, como se mide en un ensayo de PBMC mediada por el CD40L;

(iv) reacciona de manera cruzada con el polipéptido de CD40 de mono cinomolgo;

20 (v) no tiene ninguna o tiene una baja actividad de ADCC; y,

(vi) tiene propiedades adecuadas para el desarrollo de fármacos.

En una realización específica, los anticuerpos o las proteínas homólogas de acuerdo con la invención, comprenden una región Fc de IgG1 silenciosa, por ejemplo, una región Fc de IgG1 silenciosa seleccionada a partir del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19.

25 En una realización específica, la divulgación se refiere a un anticuerpo o a una proteína que tiene secuencias de nucleótidos de cadena pesada y ligera de región variable, o secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera de región variable, o las secuencias de aminoácidos o las secuencias de codificación de nucleótidos de las 6 regiones determinantes de complementariedad (CDRs) que son homólogas a las secuencias de aminoácidos o de nucleótidos correspondientes de los anticuerpos mAb1-mAb3 descritos anteriormente, en particular, en la Tabla 1, y este anticuerpo o esta proteína comprende una región Fc de IgG silenciosa seleccionada a partir del grupo que
30 consiste en la región Fc del mAb1 (SEQ ID NO: 17), la región Fc del mAb2 (SEQ ID NO: 18), y la región Fc del mAb3 (SEQ ID NO: 19), en donde el anticuerpo o la proteína homóloga se enlaza específicamente al CD40, y el anticuerpo o la proteína exhibe las siguientes propiedades funcionales: es un antagonista de CD40, no exhibe ninguna actividad agonista o exhibe una baja actividad agonista, y no tiene ninguna o tiene una baja actividad de ADCC.

35 Por ejemplo, la divulgación se refiere a anticuerpos o proteínas homólogas a los mAb1-mAb3, las cuales comprenden una región Fc de IgG silenciosa seleccionada a partir del grupo que consiste en la región Fc del mAb1 (SEQ ID NO: 17), la región Fc del mAb2 (SEQ ID NO: 18), y la región Fc del mAb3 (SEQ ID NO: 19), y que comprenden una secuencia de cadena pesada variable (V_H), y una secuencia de cadena ligera variable (V_L), en donde las secuencias de región determinante de complementariedad (CDR) comparten al menos el 60, 70, 90, 95,
40 96, 97, 98, 99 o 100 por ciento de identidad de secuencia con las secuencias de región determinante de complementariedad (CDR) correspondientes de los mAb1-mAb3, respectivamente, las SEQ ID NOs:1-6, en donde el anticuerpo o la proteína homóloga se enlaza específicamente al CD40, y el anticuerpo o la proteína homóloga exhibe las siguientes propiedades funcionales: es un antagonista de CD40, no exhibe ninguna actividad agonista o exhibe una baja actividad agonista, y no tiene ninguna o tiene una baja actividad de ADCC.

45 En una realización específica relacionada, el anticuerpo o la proteína homóloga:

a) se enlaza a CD40 con una KD de 1 nM o menos;

b) inhibe la señalización inducida por CD40L con una IC₅₀ de 50 nanogramos/mililitro o menos, como se mide en el ensayo de PBMC mediada por el CD40L descrito en los Ejemplos;

50 c) no tiene ninguna actividad agonista o tiene una baja actividad agonista, como se mide en un bioensayo, tal como el ensayo de PBMC mediada por el CD40L, como se describe en los Ejemplos; y

d) no tiene ninguna actividad o tiene una baja actividad de ADCC.

La divulgación se refiere además a anticuerpos o proteínas homólogas a los mAb1-mAb3, las cuales comprenden una región Fc de IgG silenciosa seleccionada a partir del grupo que consiste en la región Fc del mAb1 (SEQ ID NO: 17), la región Fc del mAb2 (SEQ ID NO: 18), y la región Fc del mAb3 (SEQ ID NO: 19), y que comprenden una secuencia de cadena pesada variable (V_H), y una secuencia de cadena ligera variable (V_L), las cuales comparten al menos el 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de identidad de secuencia con las secuencias (V_H) y (V_L) correspondientes de los mAb1-mAb3, respectivamente, las SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, en donde el anticuerpo o la proteína homóloga se enlaza específicamente al CD40, y el anticuerpo o la proteína exhibe las siguientes propiedades funcionales: es un antagonista de CD40, no exhibe ninguna actividad agonista o exhibe una baja actividad agonista, y no tiene ninguna o tiene una baja actividad de ADCC.

En una realización específica relacionada, el anticuerpo o la proteína homóloga:

a) se enlaza a CD40 con una KD de 1 nM o menos;

b) inhibe la señalización inducida por CD40L con una IC₅₀ de 50 nanogramos/mililitro o menos, como se mide en el ensayo de PBMC mediada por el CD40L descrito en los Ejemplos;

c) no tiene ninguna actividad agonista o tiene una baja actividad agonista, como se mide en un bioensayo, tal como el ensayo de PBMC mediada por el CD40L descrito en los Ejemplos; y

d) no tiene ninguna actividad o tiene una baja actividad de ADCC.

En otro ejemplo, la divulgación se refiere a anticuerpos o proteínas homólogas a los mAb1-mAb3, las cuales comprenden una región Fc de IgG silenciosa seleccionada a partir del grupo que consiste en la región Fc del mAb1 (SEQ ID NO: 17), la región Fc del mAb2 (SEQ ID NO: 18), y la región Fc del mAb3 (SEQ ID NO: 19), y en donde: las cadenas pesadas y ligeras variables son codificadas por una secuencia de nucleótidos que es al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o el 100 % idéntica a la secuencia de codificación de nucleótidos correspondiente de las cadenas pesadas y ligeras variables de los mAb1-mAb3, en donde el anticuerpo o la proteína homóloga se enlaza específicamente al CD40, y el anticuerpo o la proteína exhibe las siguientes propiedades funcionales: es un antagonista de CD40, no exhibe ninguna actividad agonista o exhibe una baja actividad agonista, y no tiene ninguna o tiene una baja actividad de ADCC.

En una realización específica relacionada, el anticuerpo o la proteína homóloga:

a) se enlaza a CD40 con una KD de 1 nM o menos;

b) inhibe la señalización inducida por CD40L con una IC₅₀ de 50 nanogramos/mililitro o menos, como se mide en el ensayo de PBMC mediada por el CD40L descrito en los Ejemplos;

c) no tiene ninguna actividad agonista o tiene una baja actividad agonista, como se mide en un bioensayo, tal como el ensayo de PBMC mediada por el CD40L descrito en los Ejemplos; y

d) no tiene ninguna actividad o tiene una baja actividad de ADCC.

Los anticuerpos con secuencias de aminoácidos mutantes se pueden obtener mediante mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mediada por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)) de las moléculas de ácidos nucleicos codificantes, seguida por la prueba del anticuerpo alterado codificado para determinar la función conservada (es decir, las funciones estipuladas anteriormente), utilizando los ensayos funcionales descritos en los Ejemplos más adelante.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o las proteínas homólogas a los mAb1-mAb3, como se describen anteriormente, tienen modificaciones de secuencias conservadoras.

Como se utiliza en la presente, el término "modificaciones de secuencias conservadoras" pretende referirse a las sustituciones de aminoácidos en donde el residuo de aminoácido es reemplazado con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de los residuos de aminoácidos que tiene cadenas laterales similares se han definido en este campo. Estas familias incluyen los aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales con ramificación beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina), y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por consiguiente, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de un anticuerpo de la divulgación, pueden ser reemplazados con otros residuos de aminoácidos a partir de la misma familia de la cadena lateral, y el anticuerpo alterado se puede probar para determinar la función conservada utilizando los ensayos funcionales descritos en la presente.

Se pueden introducir modificaciones en un anticuerpo de la divulgación mediante las técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Moléculas de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos o las proteínas de la divulgación

- 5 Otro aspecto de la divulgación pertenece a moléculas de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos o las proteínas de la divulgación, como se describen anteriormente.

Los ejemplos de las secuencias de nucleótidos de cadena ligera y pesada de cualquiera de los mAb1 a mAb3 se pueden derivar a partir de la Tabla 3 (que muestra las secuencias de codificación de nucleótidos enteras de las cadenas pesadas y ligeras de los mAb1 a mAb3).

- 10 Otros ejemplos de las secuencias de nucleótidos de cadena ligera y pesada de acuerdo con la divulgación son cualquier secuencia que codifique para las secuencias de aminoácidos pesadas y/o ligeras de longitud completa de los mAb1, mAb2 o mAb3, como se describen en la Tabla 1.

La divulgación también pertenece a moléculas de ácidos nucleicos que se derivan a partir de las últimas secuencias que se han optimizado para la expresión de la proteína en células de mamífero, por ejemplo, las líneas celulares CHO.

- 15 Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en las células enteras, en un lisado celular, o pueden ser ácidos nucleicos en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico está "aislado" o "se hace sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas convencionales, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, formación de bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa, y otras bien conocidas en este campo. Véase F. Ausubel, y colaboradores, Editores, 1987 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico de la divulgación puede ser, por ejemplo, ADN o ARN, y puede o no contener secuencias intrónicas. En una realización, el ácido nucleico es una molécula de ADNc. El ácido nucleico puede estar presente en un vector, tal como un vector de exhibición de fago, o en un vector de plásmido recombinante.

- 20 Los ácidos nucleicos de la divulgación se pueden obtener empleando técnicas de biología molecular convencionales. Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican, por ejemplo, los segmentos V_H y V_L , estos fragmentos de ADN se pueden manipular adicionalmente mediante técnicas de ADN recombinante convencionales, por ejemplo, para convertir los genes de región variable hasta genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, hasta genes de fragmentos Fab, o hasta un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifique V_L o V_H se enlaza operativamente a otra molécula de ADN, o a un fragmento que codifique la región constante de anticuerpo de los mAb1-mAb3 que comprenden la región Fc como se definen en las SEQ ID NOs: 17-19.

- 35 El término "operativamente enlazado", como se utiliza en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN se unen de una manera funcional, por ejemplo, de tal manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen dentro del marco, o de tal manera que la proteína se expresa bajo el control de un promotor deseado.

- 40 El ADN aislado que codifica la región V_H se puede convertir hasta un gen de cadena pesada de longitud completa mediante el enlace operativo del ADN que codifique V_H a otra molécula de ADN que codifique las regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2, y CH3). Las secuencias de los genes de región constante de cadena pesada humanos son conocidas en este campo (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., y colaboradores, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, NIH Publicación Número 91-3242), y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante una amplificación convencional con reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La región constante de cadena pesada se puede seleccionar entre los isotipos IgG1 que comprenden la región Fc, como se definen en las SEQ ID NOs: 17-19.

- 45 El ADN aislado que codifica la región V_L se puede convertir hasta un gen de cadena ligera de longitud completa (así como hasta un gen de cadena ligera de Fab), mediante el enlace operativo del ADN que codifique V_L a otra molécula de ADN que codifique la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de los genes de región constante de cadena ligera humanos son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., y colaboradores, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, NIH Publicación Número 91-3242), y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante una amplificación convencional con reacción en cadena de la polimerasa. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

- 55 Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos o las proteínas de la divulgación también se pueden producir en un transfectoma de células

huésped utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de genes, como es bien conocido en este campo (por ejemplo, Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202).

Por ejemplo, con el fin de expresar los anticuerpos, se pueden obtener los ADNs que codifiquen las cadenas ligera y pesada de longitud parcial o completa mediante las técnicas de biología molecular o de bioquímica convencionales (por ejemplo, síntesis química del ADN, amplificación con reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o clonación del ADNc utilizando un hibridoma que exprese el anticuerpo de interés), y los ADNs se pueden insertar en los vectores de expresión, de tal manera que los genes se enlacen operativamente a las secuencias de control de transcripción y de traducción. En este contexto, el término "enlazado operativamente" pretende significar que un gen de anticuerpo se liga en un vector, de tal manera que las secuencias de control de transcripción y de traducción dentro del vector sirven para su función pretendida de regular la transcripción y la traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se seleccionan para ser compatibles con la célula huésped de expresión utilizada. El gen de cadena ligera del anticuerpo y el gen de cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en un vector separado, o más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión.

Los genes de anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante métodos convencionales (por ejemplo, ligamiento de los sitios de restricción complementarios sobre el fragmento del gen de anticuerpo y el vector, o ligamiento de extremos romos si no hay sitios de restricción presentes). Las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en la presente se pueden utilizar para crear genes de anticuerpo de longitud completa, mediante su inserción en los vectores de expresión que ya codifiquen las regiones constantes de cadena pesada y constantes de cadena ligera de la secuencia deseada correspondiente a dichas regiones constantes de los mAb1, mAb2 o mAb3, de tal manera que el segmento V_H se enlace operativamente a los segmentos V_H dentro del vector, y el segmento V_L se enlace operativamente al segmento CL dentro del vector. Adicionalmente o de una manera alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señal que facilite la secreción de la cadena de anticuerpo a partir de una célula huésped. El gen de la cadena de anticuerpo se puede clonar en el vector, de tal manera que el péptido de señal se enlace dentro del marco al término amino del gen de la cadena de anticuerpo. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido de señal heterólogo (es decir, un péptido de señal a partir de una proteína que no es inmunoglobulina).

En adición a los genes de cadenas de anticuerpos, los vectores de expresión recombinante de la divulgación llevan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena del anticuerpo en una célula huésped. El término "secuencia reguladora" pretende incluir los promotores, los potenciadores, y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, las señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o la traducción de los genes de la cadena del anticuerpo. Estas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA 1990). Será apreciado por los expertos en este campo que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de las secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se vaya a transformar, del nivel de expresión de proteína deseado, etc. Las secuencias reguladoras para la expresión de células huésped de mamífero incluyen los elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteína en las células de mamífero, tales como los promotores y/o los potenciadores derivados a partir de citomegalovirus (CMV), virus de simio 40 (SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío mayor de adenovirus (AdMLP)), y polioma. De una manera alternativa, se pueden utilizar las secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor de ubiquitina o el promotor de P-globina. Todavía adicionalmente, se pueden utilizar los elementos reguladores que están compuestos de secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor SRa, que contiene las secuencias a partir del promotor temprano de SV40, y la repetición terminal larga del virus de leucemia de células T humanas tipo 1 (Takabe, Y. y colaboradores, 1988 *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

En adición a los genes de cadena de anticuerpo y a las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la divulgación pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulen la réplica del vector en las células huésped (por ejemplo, orígenes de réplica), y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de las células huésped en donde se haya introducido el vector (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 4,399,216, 4,634,665 y 5,179,017, todas por Axel y colaboradores). Por ejemplo, típicamente, el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como a G418, higromicina, o metotrexato, a una célula huésped en donde se haya introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables incluyen el gen de reductasa de dihidrofolato (DHFR) (para utilizarse en las células huésped de DHFR con selección/amplificación de metotrexato), y el gen neo (para la selección de G418).

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, los vectores de expresión que codifiquen las cadenas pesada y ligera, se transfectan en una célula huésped mediante técnicas convencionales. Las diferentes formas del término "transfección" pretenden abarcar una amplia variedad de técnicas comúnmente empleadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariótica o eucariótica, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano, y similares. Teóricamente, es posible expresar los anticuerpos de la divulgación en células huésped ya sean procarióticas o bien eucarióticas. La expresión de los anticuerpos en las células eucarióticas, por ejemplo, en las células huésped de mamífero, en levadura, o en hongos filamentosos, se discute debido a que estas células eucarióticas, y en particular las células de mamífero, tienen más probabilidades que las células procarióticas para ensamblarse y secretar un anticuerpo apropiadamente plegado e

inmunológicamente activo.

En una realización específica, un vector de clonación o de expresión de acuerdo con la divulgación comprende cualquiera de al menos una de las siguientes secuencias de codificación (a)-(c), operativamente enlazada a las secuencias promotoras adecuadas:

- 5 (a) SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23 que codifican respectivamente las cadenas pesadas y ligeras de longitud completa del mAb1;
- (b) SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25 que codifican respectivamente las cadenas pesadas y ligeras de longitud completa del mAb2; o
- 10 (c) SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27 que codifican respectivamente las cadenas pesadas y ligeras de longitud completa del mAb3.

15 Las células huésped de mamífero para expresar los anticuerpos recombinantes de la divulgación incluyen las células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo las células CHO de DHFR, descritas por Urlaub y Chasin, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 77: 4216-4220, utilizadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp, 1982 *Mol. Biol.* 159: 601-621), las líneas celulares CHOK1 dhfr+, las células de mieloma NSO, las células COS, y las células SP2). En particular, para utilizarse con las células de mieloma NSO, otro sistema de expresión es el sistema de expresión genética GS mostrado en las Publicaciones Internacionales del TCP Números WO 87/04462 y WO89/01036, y en la Patente Europea Número EP 0,338,841.

20 Cuando se introducen vectores de expresión recombinante que codifican genes de anticuerpos en las células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen mediante el cultivo de las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped, o la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en donde se hagan crecer las células huésped. Los anticuerpos se pueden recuperar a partir del medio de cultivo empleando métodos de purificación de proteínas convencionales. (Véase, por ejemplo, Abhinav y colaboradores, 2007, *Journal of Chromatography* 848: 28-37).

25 En una realización específica, la célula huésped de la divulgación es una célula huésped transfectada con un vector de expresión que tiene las secuencias de codificación seleccionadas a partir del grupo que consiste en (a)-(c) adecuadas para la expresión de los mAb1-mAb3, respectivamente, operativamente enlazadas a las secuencias promotoras adecuadas:

- (a) SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23;
- (b) SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25; y
- 30 (c) SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27.

Estas últimas células huésped se pueden cultivar entonces adicionalmente bajo condiciones adecuadas para la expresión y producción de un anticuerpo de la divulgación seleccionado a partir del grupo que consiste en los mAb1-mAb3, respectivamente.

Moléculas biespecíficas

35 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona moléculas biespecíficas o multiespecíficas que comprenden un anticuerpo o una proteína anti-CD40 de la divulgación. Un anticuerpo o una proteína de la divulgación se puede derivar o enlazar a otra molécula funcional, por ejemplo a otro péptido o a otra proteína (por ejemplo, a otro anticuerpo o ligando para un receptor), con el fin de generar una molécula biespecífica que se enlace a al menos dos sitios de enlace o moléculas objetivo diferentes. El anticuerpo de la divulgación, de hecho, se puede derivar o

40 enlazar a más de una molécula funcional diferente para generar moléculas multiespecíficas que se enlacen a más de dos sitios de enlace y/o moléculas objetivo diferentes; estas moléculas multiespecíficas también pretenden ser abarcadas por el término "molécula biespecífica", como se utiliza en la presente. Con el fin de crear una molécula biespecífica de la divulgación, un anticuerpo o una proteína de la divulgación se puede enlazar funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente, o de otra manera), a una o más

45 moléculas de enlace diferentes, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de enlace, de tal manera que resulte una molécula biespecífica.

De conformidad con lo anterior, la presente divulgación incluye las moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de enlace para CD40, por ejemplo, una porción de enlace de antígeno de

50 cualquiera de los mAb1-mAb3, y una segunda especificidad de enlace para un segundo epítipo objetivo. Por ejemplo, el segundo epítipo objetivo es otro epítipo de CD40 diferente del primer epítipo objetivo. Otro ejemplo es una molécula biespecífica que comprende al menos una primera especificidad de enlace para CD40, por ejemplo, una porción de enlace de antígeno de cualquiera de los mAb1-mAb3, y una segunda especificidad de enlace para un epítipo dentro de CD40.

Adicionalmente, para la divulgación en donde la molécula biespecífica es multiespecífica, la molécula puede incluir

además una tercera especificidad de enlace, en adición a los primero y segundo epítomos objetivo.

Las moléculas biespecíficas de la presente divulgación se pueden preparar mediante la conjugación de las especificidades de enlace constituyentes, empleando los métodos conocidos en este campo. Por ejemplo, cada especificidad de enlace de la molécula biespecífica se puede generar por separado, y luego se pueden conjugar
 5 unas con otras. Cuando las especificidades de enlace son proteínas o péptidos, se puede utilizar una variedad de agentes de acoplamiento o de reticulación para la conjugación covalente. Los ejemplos de los agentes de reticulación incluyen Proteína A, carbodi-imida, tioacetato de N-succinimidil-S-acetilo (SATA), 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitro-benzoico) (DTNB), o-fenilen-dimaleimida (oPDM), 3-(2-ditiopiridil)-propionato de N-succinimidilo (SPDP), y 4-(N-maleimido-metil)-ciclohexan-1-carboxilato de sulfo-succinimidilo (sulfo-SMCC) (véanse, por ejemplo, Karpovsky y colaboradores, 1984 *J. Exp. Med.* 160: 1686; Liu, MA y colaboradores, 1985 *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 82: 8648). Otros métodos incluyen aquéllos descritos en Paulus, 1985 *Behring Ins. Mitt.* No. 78, 118-132; Brennan y colaboradores, 1985 *Science* 229: 81-83; y Glennie y colaboradores, 1987 *J. Immunol.* 139: 2367-2375). Los agentes de conjugación son SATA y sulfo-SMCC, estando ambos disponibles en Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

10 Cuando las especificidades de enlace son anticuerpos, éstos se pueden conjugar mediante el enlace con sulfhidrilo de las regiones de articulación del término C de las dos cadenas pesadas. En una realización particular, la región de articulación se modifica para contener un número non de residuos de sulfhidrilo, por ejemplo, uno, antes de la conjugación.

De una manera alternativa, ambas especificidades de enlace se pueden codificar en el mismo vector, y se pueden expresar y ensamblar en la misma célula huésped. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es una proteína de fusión de mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂, o ligando x Fab. Una molécula biespecífica de la divulgación puede ser una molécula de una sola cadena que comprenda un anticuerpo de una sola cadena y un determinante de enlace, o una molécula biespecífica de una sola cadena que comprenda dos determinantes de enlace. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas de una sola cadena. Los métodos para la preparación de las moléculas biespecíficas se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,260,203; en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,455,030; en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,881,175; en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,132,405; en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,091,513; en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,476,786; en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,013,653; en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,258,498; y en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,482,858.

El enlace de las moléculas biespecíficas a sus objetivos específicos se puede confirmar, por ejemplo, mediante el ensayo inmunsorbente enlazado con enzimas (ELISA), el radio-inmunoensayo (RIA), el análisis FACS, un bioensayo (por ejemplo, inhibición del crecimiento), o el ensayo Western blot. Cada uno de estos ensayos detecta en general la presencia de los complejos de proteína-anticuerpo de interés particular, mediante el empleo de un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés.

Anticuerpos multivalentes

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona anticuerpos multivalentes que comprenden al menos dos porciones de enlace de antígeno idénticas o diferentes de los anticuerpos de la divulgación, que se enlazan al CD40, por ejemplo, seleccionadas a partir de las porciones de enlace de antígeno de cualquiera de los mAb1-mAb3. En una realización, los anticuerpos multivalentes proporcionan al menos dos, tres, o cuatro porciones de enlace de antígeno de los anticuerpos. Las porciones de enlace de antígeno se pueden enlazar entre sí por medio de fusión de proteína o de un enlace covalente o no covalente. De una manera alternativa, se han descrito los métodos de enlace para las moléculas biespecíficas. Los compuestos tetravalentes se pueden obtener, por ejemplo, mediante la reticulación de los anticuerpos de la divulgación con un anticuerpo que se enlace a las regiones constantes de los anticuerpos de la divulgación, por ejemplo, la región Fc o de articulación.

Métodos de terapia utilizando los anticuerpos antagonistas anti-CD40 de la divulgación

Los métodos de la divulgación se refieren al uso de los anticuerpos o de las proteínas anti-CD40 de la divulgación para tratar sujetos (es decir, pacientes) que tengan una enfermedad autoinmune y/o una enfermedad inflamatoria, o una predisposición a desarrollar una enfermedad autoinmune y/o una enfermedad inflamatoria, en donde la enfermedad y/o inflamación sea mediada por la señalización de CD40 mediada por el CD40L en las células que expresen el antígeno de CD40.

Los métodos para detectar la expresión de CD40 en las células son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la inmunohistoquímica, la citometría de flujo, Western blot, ELISA, y similares.

Los métodos de la divulgación son en especial útiles para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes en donde esté involucrada la estimulación de CD40 mediada por el CD40L.

Las enfermedades inflamatorias se caracterizan por inflamación y destrucción del tejido, o una combinación de las

mismas. "Una enfermedad inflamatoria" incluye cualquier proceso inflamatorio inmunológicamente mediado en donde el suceso iniciador o el objetivo de la respuesta inmunitaria involucra antígenos no propios, incluyendo, por ejemplo, aloantígenos, xenoantígenos, antígenos virales, antígenos bacterianos, antígenos desconocidos, o alérgenos.

5 Además, para los propósitos de la presente divulgación, el término "enfermedades inflamatorias" incluye "enfermedades autoinmunes". Como se utiliza en la presente, el término "autoinmunidad" se entiende en general para abarcar los procesos inflamatorios inmunológicamente mediados que involucran a los antígenos "propios" (auto-antígenos). En las enfermedades autoinmunes, los antígenos propios (auto-antígenos) desencadenan las respuestas inmunitarias del huésped.

10 También, la presente divulgación incluye el tratamiento de la inflamación asociada con un rechazo de trasplante de tejido. "Rechazo de trasplante" o "rechazo de injerto" se refiere a cualquier respuesta inmunitaria montada por el huésped contra un injerto, incluyendo, pero no limitándose a, antígenos de HLA, antígenos de grupo sanguíneo, y similares.

15 La divulgación también se puede utilizar para tratar la enfermedad del injerto contra el huésped, tal como aquella asociada con trasplante de médula ósea, por ejemplo. En esta enfermedad del injerto contra el huésped, la médula ósea del donador incluye linfocitos y células que maduran hasta linfocitos. Los linfocitos del donador reconocen los antígenos del receptor como no propios, y montan una respuesta inmunitaria inflamatoria. Por consiguiente, como se utiliza en la presente, la "enfermedad del injerto contra el huésped" o la "reacción del injerto contra el huésped" se refiere a cualquier respuesta inmunitaria mediada por las células T, en donde los linfocitos del donador reaccionan a los antígenos del huésped.

20 Los anticuerpos o las proteínas antagonistas anti-CD40 descritos en la presente, por ejemplo, mAb1, mAb2 o mAb3, se pueden utilizar de acuerdo con los métodos de la divulgación para tratar trastornos autoinmunes y/o inflamatorios, incluyendo, pero no limitándose a, lupus eritematoso sistémico (SLE), lupus discoide, nefritis por lupus, sarcoidosis, artritis inflamatoria, incluyendo artritis juvenil, artritis reumatoide, artritis sorbiática, síndrome de Reiter, espondilitis anquilosante, y artritis gotosa, rechazo de un trasplante de un órgano o tejido, rechazo hiper-agudo, agudo, o crónico y/o enfermedad del injerto contra el huésped, esclerosis múltiple, hiper-síndrome de IgE, poliarteritis nodosa, cirrosis biliar primaria, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca (enteropatía sensible al gluten), síndrome de Sjögren primario (pSS), hepatitis autoinmune, anemia perniciosa, anemia hemolítica autoinmune, soriasis, esclerodermia, miastenia grave, púrpura trombocitopénica autoinmune, tiroiditis autoinmune, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad inmunocompleja, fatiga crónica, síndrome de disfunción inmune (CFIDS), polimiositis y dermatomiositis, crioglobulinemia, trombólisis, cardiomiopatía, pénfigo vulgar, fibrosis pulmonar intersticial, diabetes mellitus tipo I y tipo II, hipersensibilidad de tipo retardado tipo 1, 2, 3, y 4, alergia o trastornos alérgicos, respuestas inmunitarias indeseadas/no pretendidas a las proteínas terapéuticas (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 2002/0119151 y Koren y colaboradores, (2002) Curr. Pharm. Biotechnol. 3: 349-60), asma, síndrome de Churg-Strauss (granulomatosis alérgica), dermatitis atópica, dermatitis alérgica y por contacto irritante, urticaria, alergia mediada por IgE, aterosclerosis, vasculitidas asociadas con ANCA, vasculitis, miopatías inflamatorias idiopáticas, enfermedad hemolítica, enfermedad de Alzheimer, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, y similares.

35 La ablación genética o la inhibición farmacológica de la senda de CD40-CD154 ha demostrado anteriormente un beneficio terapéutico ya sea en modelos clínicos o pre-clínicos de SLE, pSS, ITP, MS, enfermedad de Crohn, pénfigo vulgar, vasculitis autoinmune y RA (Law CL, Grewal IS. (2009). Adv. Exp. Med. Biol. 2009; 647: 8-36); cuya necesidad médica se detalla más adelante.

40 En las realizaciones preferidas, los anticuerpos o las proteínas anti-CD40 de la divulgación son útiles en el tratamiento de: (i) lupus eritematoso sistémico (nefritis por lupus), de preferencia para proporcionar terapias efectivas de dispersión de esteroides para la inducción y el mantenimiento de la remisión, y para la prevención de enfermedad renal en etapa terminal; (ii) síndrome de Sjögren primario, de preferencia para la prevención de destrucción de glándulas salivales y lagrimales, y para la inducción y el mantenimiento de la remisión de las manifestaciones extraglandulares; (iii) púrpura trombocitopénica autoinmune, de preferencia, el tratamiento de los pacientes refractarios al estándar de cuidado; (iv) vasculitidas asociadas con ANCA, de preferencia para la inducción y el mantenimiento de la remisión en los pacientes refractarios a corticosteroides, y para el tratamiento de dispersión de esteroides; (v) pénfigo vulgar, de preferencia para la inducción y el mantenimiento de la remisión en los pacientes refractarios a corticosteroides, y para el tratamiento de dispersión de esteroides; (vi) esclerosis múltiple, de preferencia para proporcionar tratamientos más efectivos para la prevención de recurrencias y del progreso de la discapacidad, y para lograr el estado libre de la enfermedad; y (vii) enfermedad de Crohn, de preferencia para proporcionar terapias más efectivas para el mantenimiento de la remisión, y el tratamiento de los pacientes refractarios a anti-TNF.

55 En algunas otras realizaciones, los anticuerpos o las proteínas anti-CD40 de la divulgación son útiles en el tratamiento de inflamación pulmonar, incluyendo, pero no limitándose a, rechazo de injerto de pulmón, asma, sarcoidosis, enfisema, fibrosis quística, fibrosis pulmonar idiopática, bronquitis crónica, rinitis alérgica y enfermedades alérgicas del pulmón, tales como neumonitis por hipersensibilidad, neumonía eosinofílica,

60

bronquiolitis obliterante debida a trasplante de médula ósea y/o de pulmón o a otras causas, aterosclerosis de injerto/fleboesclerosis de injerto, así como fibrosis pulmonar resultante de enfermedades por colágeno, vasculares, y autoinmunes, tales como artritis reumatoide, esclerodermia y lupus eritematoso.

5 "Tratamiento" se define en la presente como la aplicación o administración de un anticuerpo o de una proteína anti-CD40 de acuerdo con la divulgación, por ejemplo, anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3, a un sujeto, o la aplicación o administración de una composición farmacéutica, la cual comprende el anticuerpo o la proteína anti-CD40 de la divulgación a un tejido aislado o a una línea celular de un sujeto, en donde el sujeto tiene una enfermedad autoinmune y/o una enfermedad inflamatoria, un síntoma asociado con una enfermedad autoinmune y/o con una enfermedad inflamatoria, o una predisposición al desarrollo de una enfermedad autoinmune y/o de una enfermedad inflamatoria, en donde el propósito es curar, sanar, aliviar, liberar, alterar, remediar, mitigar, mejorar, o afectar la enfermedad autoinmune y/o la enfermedad inflamatoria, cualesquiera síntomas asociados con la enfermedad autoinmune y/o con la enfermedad inflamatoria, o la predisposición al desarrollo de la enfermedad autoinmune y/o de la enfermedad inflamatoria.

15 "Tratamiento" también significa la aplicación o administración de una composición farmacéutica, la cual comprende un anticuerpo o una proteína anti-CD40 de la divulgación, por ejemplo, un anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3, a un sujeto, o la aplicación o administración de una composición farmacéutica, la cual comprende el anticuerpo o la proteína anti-CD40 de la divulgación, a un tejido aislado o a una línea celular de un sujeto, en donde el sujeto tiene una enfermedad autoinmune y/o una enfermedad inflamatoria, un síntoma asociado con una enfermedad autoinmune y/o con una enfermedad inflamatoria, o una predisposición al desarrollo de una enfermedad autoinmune y/o de una enfermedad inflamatoria, en donde el propósito es curar, sanar, aliviar, liberar, alterar, remediar, mitigar, mejorar, o afectar la enfermedad autoinmune y/o la enfermedad inflamatoria, cualesquiera síntomas asociados con la enfermedad autoinmune y/o con la enfermedad inflamatoria, o la predisposición al desarrollo de la enfermedad autoinmune y/o de la enfermedad inflamatoria.

25 "Actividad anti-inflamatoria" significa una reducción o prevención de la inflamación. La terapia con al menos un anticuerpo o una proteína anti-CD40 de acuerdo con la divulgación, provoca una respuesta fisiológica que es benéfica con respecto al tratamiento de una enfermedad autoinmune y/o de una enfermedad inflamatoria, en donde la enfermedad involucra células que expresan el antígeno de CD40. Se reconoce que los métodos de la divulgación pueden ser útiles en la prevención del cambio fenotípico en las células, tal como proliferación, activación, y similares.

30 De acuerdo con los métodos de la presente divulgación, al menos un anticuerpo o una proteína anti-CD40 de la divulgación, como se define anteriormente en la presente, se utiliza para promover una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento o a la prevención de una enfermedad autoinmune y/o de una enfermedad inflamatoria.

35 "Respuesta terapéutica positiva" con respecto a una enfermedad autoinmune y/o a una enfermedad inflamatoria significa una mejora en la enfermedad en asociación con la actividad anti-inflamatoria de estos anticuerpos o de estas proteínas, y/o una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad. Es decir, se puede observar un efecto anti-proliferativo, la prevención de una proliferación adicional de las células que expresan CD40, una reducción en la respuesta inflamatoria, incluyendo, pero no limitándose a, una secreción reducida de citoquinas inflamatorias, moléculas de adhesión, proteasas, inmunoglobulinas (en las instancias en donde la célula portadora de CD40 es una célula-B), combinaciones de las mismas, y similares, un aumento en la producción de proteínas anti-inflamatorias, una reducción en el número de células auto-reactivas, un aumento en la tolerancia inmunológica, la inhibición de la sobrevivencia de células auto-reactivas, y/o una disminución en uno o más síntomas mediados por la estimulación de las células que expresan CD40. Estas respuestas terapéuticas positivas no están limitadas a la vía de administración, y pueden comprender la administración al donador, al tejido del donador (tal como, por ejemplo, perfusión de órgano), al huésped, o a cualquier combinación de los mismos, y similares.

45 La respuesta clínica se puede evaluar utilizando técnicas de rastreo, tales como exploración de toma de imágenes de resonancia magnética (MRI), toma de imágenes radiográficas-X, exploración tomográfica computarizada (CT), citometría de flujo o análisis del clasificador de células activado por fluorescencia (FACS), histología, patología general, y química sanguínea, incluyendo, pero no limitándose a, cambios detectables mediante ELISA, RIA, cromatografía, y similares. En adición a estas respuestas terapéuticas positivas, el sujeto que se someta a terapia con el anticuerpo o con la proteína antagonista anti-CD40 de la divulgación puede experimentar el efecto benéfico de una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad.

"Dosis o cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad efectiva" significa una cantidad de anticuerpo o proteína anti-CD40 de la divulgación que, cuando se administra provoca una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento de un sujeto con una enfermedad autoinmune y/o con una enfermedad inflamatoria.

55 En algunas realizaciones de la divulgación, una dosis terapéuticamente efectiva del anticuerpo o de la proteína anti-CD40 de la divulgación, por ejemplo, mAb1, mAb2 o mAb3, está en el intervalo de 0.01 mg/kg a 40 mg/kg, de 3 mg/kg a 20 mg/kg, o de 7 mg/kg a 12 mg/kg. Se reconoce que el método de tratamiento puede comprender una sola administración de una dosis terapéuticamente efectiva, o múltiples administraciones de una dosis terapéuticamente efectiva del anticuerpo o de la proteína antagonista anti-CD40 de la divulgación.

Una realización adicional de la divulgación es el uso de los anticuerpos o de las proteínas anti-CD40 de la divulgación para la monitorización de diagnóstico de los niveles de proteína en el tejido como parte de un procedimiento de prueba clínica, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección se puede facilitar mediante el acoplamiento del anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de las sustancias detectables incluyen diferentes enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, biomateriales luminiscentes, y materiales radiactivos. Los ejemplos de las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de radícula roja, fosfatasa alcalina, P-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los ejemplos de los complejos de grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, dicloro-triazinil-amina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de los biomateriales luminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y acuorina; y los ejemplos del material radiactivo adecuado incluyen ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, o ³H.

Los anticuerpos o las proteínas anti-CD40 de la divulgación, por ejemplo, mAb1, mAb2 o mAb3, se pueden utilizar en combinación con cualesquiera terapias conocidas para las enfermedades autoinmunes e inflamatorias, incluyendo cualquier agente o combinación de agentes que se sepa que son útiles, o los cuales se hayan utilizado o se utilicen actualmente, para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Estas terapias y agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, cirugía o procedimientos quirúrgicos (por ejemplo, esplenectomía, linfadenectomía, tiroidectomía, plasmaforesis, leucoforesis, trasplante de células, tejidos, u órganos, procedimientos intestinales, perfusión de órgano, y similares), terapia de radiación, terapia tal como terapia esteroidea y terapia no esteroidea, terapia de hormonas, terapia de citoquina, terapia con agentes dermatológicos (por ejemplo, agentes tópicos utilizados para tratar condiciones de la piel, tales como alergias, dermatitis por contacto, y soriasis), terapia inmunosupresora, y otra terapia anti-inflamatoria con anticuerpos monoclonales, y similares. De esta manera, los anticuerpos o las proteínas antagonistas anti-CD40 descritas en la presente se administran en combinación con al menos otra terapia, incluyendo, pero no limitándose a, cirugía, perfusión de órgano, terapia de radiación, terapia esteroidea, terapia no esteroidea, terapia con antibióticos, terapia anti-fúngica, terapia de hormonas, terapia de citoquina, terapia con agentes dermatológicos (por ejemplo, agentes tópicos utilizados para tratar condiciones de la piel, tales como alergias, dermatitis por contacto, y soriasis), terapia inmunosupresora, otra terapia anti-inflamatoria con anticuerpos monoclonales, combinaciones de las mismas, y similares.

Por consiguiente, cuando las terapias combinadas comprenden la administración de un anticuerpo o de una proteína anti-CD40 de la divulgación, tal como un anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3, en combinación con la administración de otro agente terapéutico, como con esteroides como un ejemplo, los métodos de la divulgación abarcan la co-administración, utilizando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden. Cuando los métodos de la presente divulgación comprenden regímenes terapéuticos combinados, estas terapias se pueden dar de una manera simultánea, es decir, el anticuerpo o la proteína anti-CD40 de la divulgación se administra de una manera concurrente o dentro del mismo marco de tiempo que la otra terapia (es decir, las terapias continúan de una manera concurrente, pero el anticuerpo o la proteína anti-CD40 de la divulgación no se administra precisamente al mismo tiempo que la otra terapia). De una manera alternativa, el anticuerpo anti-CD40 de la presente divulgación o la proteína de la divulgación también se puede administrar antes o después de la otra terapia.

La administración en secuencia de las diferentes terapias se puede llevar a cabo independientemente de si el sujeto tratado responde al primer curso de la terapia para disminuir la posibilidad de la remisión o de la recurrencia.

En algunas realizaciones de la divulgación, los anticuerpos o las proteínas anti-CD40 de la divulgación, por ejemplo, el anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3, se administran en combinación con fármacos inmunosupresores o fármacos anti-inflamatorios, en donde el anticuerpo o la proteína y los agentes terapéuticos se pueden administrar en secuencia, en cualquier orden, o simultáneamente (es decir, de una manera concurrente o dentro del mismo marco de tiempo). Los ejemplos de los fármacos inmunosupresores adecuados que se pueden administrar en combinación con los anticuerpos o las proteínas antagonistas anti-CD40 de la divulgación, por ejemplo, el anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3, incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, ciclofosfamida, mizoribina, clorambucil, ciclosporina, tal como, por ejemplo, ciclosporina aerosolizada (véase, la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 2002/0006901), tacrolimus (FK506; ProGrafrM), micofenolato-mofetil, y azatioprina (6-mercaptopurina), sirolimus (rapamicina), desoxiespergualina, leflunomida y sus análogos de malono-nitrilo-amida; y proteínas inmunosupresoras, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos y fusiones de Ig anti-CTLA4, anticuerpos estimulantes anti-linfocitos-B (por ejemplo, LYMPHOSTAT-BTM), y fusiones de Ig (BLyS-Ig), anticuerpos anti-CD80 y etanorcept (Enbrel (RTM)), así como anticuerpos anti-células T, tales como anti-CD3 (OKT3), anti-CD4, y similares. Los ejemplos de los agentes anti-inflamatorios adecuados incluyen, pero no se limitan a, corticosteroides, tales como, por ejemplo, clobetasol, halobetasol, hidrocortisona, triamcinolona, betametasona, fluocinol, fluocinonida, prednisona, prednisolona, metil-prednisolona; fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDs), tales como, por ejemplo, sulfasalazina, medicamentos que contienen mesalamina (conocidos como agentes 5-ASA), celecoxib, diclofenaco, etodolaco, fenprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, quetoprofeno, meclofamato, meloxicam, nabumetona, naproxeno, oxaprozina, piroxicam, rofecoxib, salicilatos, sulindaco, y tolmetina; inhibidores de fosfodiesterasa-4, anticuerpos anti-inflamatorios, tales como adalimumab (HUMERA (RTM), un antagonista de TNF- α), e infliximab (Remicade, un antagonista de TNF- α), y similares. También se incluyen agentes inmunomoduladores de un uso

actual o potencial en el tratamiento de enfermedad autoinmune, tales como talidomida o sus análogos, tales como lenalidomida.

El rechazo de trasplante y la enfermedad del injerto contra el huésped pueden ser hiper-agudos (humorales), agudos (mediados por células T), o crónicos (de etiología desconocida), o una combinación de los mismos. Por consiguiente, los anticuerpos o las proteínas anti-CD40 de la divulgación, por ejemplo, el anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3, se utilizan en algunas realizaciones para prevenir y/o mitigar el rechazo y/o los síntomas asociados con rechazo hiper-agudo, agudo, y/o crónico de trasplante de cualquier tejido, incluyendo, pero no limitándose a, hígado, riñón, páncreas, células de islotes pancreáticos, intestino delgado, pulmón, corazón, córneas, piel, vasos sanguíneos, hueso, médula ósea heteróloga o autóloga, y similares. Los tejidos de injerto se pueden obtener a partir de cualquier donador y se pueden trasplantar en cualquier huésped receptor, y, por consiguiente, el procedimiento de trasplante puede comprender trasplantar tejido animal a seres humanos (por ejemplo, xenoinjertos), trasplantar tejido a partir de un ser humano a otro ser humano (por ejemplo, aloinjertos), y/o trasplantar tejido a partir de una parte de un cuerpo humano a otro (por ejemplo, autoinjertos).

El tratamiento con los anticuerpos o con las proteínas de la divulgación también puede reducir las secuelas de los trasplantes, tales como fiebre, anorexia, anomalías hemodinámicas, leucopenia, infiltración de glóbulos blancos del órgano/tejido trasplantado, así como las infecciones oportunistas.

En algunas realizaciones, los anticuerpos o las proteínas anti-CD40 de la divulgación, por ejemplo, el anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3, se pueden utilizar solos o en combinación con fármacos inmunosupresores para tratar y/o prevenir rechazo de trasplante, tal como rechazo hiper-agudo, agudo, y/o crónico y/o enfermedad del injerto contra el huésped.

Por consiguiente, en algunas realizaciones en donde los anticuerpos o las proteínas anti-CD40 de la divulgación se utilizan para tratar rechazo de injerto, los anticuerpos, por ejemplo, el anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3, se pueden utilizar en combinación con los fármacos inmunosupresores adecuados, incluyendo, pero no limitándose a, metotrexato; ciclofosfamida; mizoribina; clorambucil; ciclosporina, tal como, por ejemplo, ciclosporina aerosolizada (véase, la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US20020006901), tacrolimus (FK506; ProGrafm), micofenolato-mofetil, y azatioprina (6-mercaptopurina), sirolimus (rapamicina), desoxiespergualina, leflunomida y sus análogos de malono-nitrilo-amida; inmuno-moduladores, incluyendo, por ejemplo, talidomida y sus análogos; y proteínas inmunosupresoras, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos y fusiones de Ig anti-CTLA, anticuerpos estimulantes anti-linfocitos-B (por ejemplo, LYMPHOSTAT-BTM), y fusiones de Ig (BLyS-Ig), anticuerpos anti-CD80 y etanercept (Enbrel (RTM)), así como anticuerpos anti-células T, tales como anti-CD3 (OKT3), anti-CD4, y similares.

Como tales, se contempla específicamente que las composiciones y los métodos de la divulgación se utilizan en combinación con otros fármacos para mejorar adicionalmente los síntomas y los resultados en los receptores de trasplantes, tales como aquéllos que reciben injertos de pulmón o riñón, por ejemplo. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los anticuerpos o las proteínas anti-CD40 de la divulgación, por ejemplo, el anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3, se utilizan para tratar rechazo de trasplante (tal como, por ejemplo, rechazo hiper-agudo, agudo, y/o crónico o enfermedad del injerto contra el huésped en los receptores de trasplante de pulmón o de riñón), solos o en combinación con ciclosporina parenteralmente y/o no parenteralmente administrada, incluyendo, por ejemplo, ciclosporina oral, ciclosporina inyectable, ciclosporina aerosolizada (por ejemplo, inhalada), y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones en donde al menos un componente de la terapia es ciclosporina aerosolizada, la ciclosporina se suministra al pulmón del receptor mediante la inhalación de ciclosporina en una forma de aspersión en aerosol utilizando, por ejemplo, un dispositivo de suministro presurizado o un nebulizador. La ciclosporina se puede administrar ya sea en forma de polvo seco o en una forma húmeda. La ciclosporina se puede administrar como una dosis sub-terapéutica.

En algunas otras realizaciones, los anticuerpos o las proteínas anti-CD40 de la divulgación, por ejemplo, el anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3, se pueden utilizar solos o en combinación con fármacos inmunosupresores para tratar y/o prevenir la artritis reumatoide. Por consiguiente, en algunas realizaciones en donde los anticuerpos o las proteínas anti-CD40 de la divulgación; por ejemplo, el anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3, se utilizan para tratar la artritis reumatoide, los anticuerpos o las proteínas se pueden utilizar en combinación con los fármacos inmunosupresores adecuados, incluyendo, pero no limitándose a, metotrexato, ciclofosfamida, mizoribina, clorambucil, ciclosporina, tacrolimus (FK506; PROGRAFTM), micofenolato-mofetil, y azatioprina (6-mercaptopurina), sirolimus (rapamicina), desoxiespergualina, leflunomida y sus análogos de malono-nitrilo-amida; y proteínas inmunosupresoras, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos y fusiones de Ig anti-CTLA, anticuerpos estimulantes anti-linfocitos-B (por ejemplo, LYMPHOSTAT-BTM), y fusiones de Ig (BLyS-Ig), anticuerpos anti-CD20 (por ejemplo, RITUXAN (g)); el anticuerpo completamente humano HuMax-CD20, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/1-131, tositumomab (Bexxar (D), ibritumomab-tiuxetano (Zevalin (RTM)); anticuerpos anti-CD80, y etanercept (ENBREL), así como anticuerpos anti-células T, tales como anti-CD3 (OKT3), anti-CD4, y similares. Como se discute anteriormente, la efectividad del tratamiento se puede evaluar utilizando cualquier medio, e incluye, pero no se limita a, la efectividad como se mide por las respuestas clínicas definidas por los criterios del American College of Rheumatology, los criterios de la European League of Rheumatism, o cualesquiera otros criterios. Véase, por ejemplo, Felson y colaboradores (1995) Arthritis Rheum. 38 : 727-35 y van Gestel y colaboradores (1996)

Arthritis Rheum. 39: 34-40.

En todavía otras realizaciones, los anticuerpos o las proteínas anti-CD40 de la divulgación, por ejemplo, el anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3, se pueden utilizar solos o en combinación con fármacos inmunosupresores para tratar y/o prevenir esclerosis múltiple. Por consiguiente, en algunas realizaciones en donde los anticuerpos o las proteínas anti-CD40 de la divulgación, por ejemplo, el anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3, se utilizan para tratar esclerosis múltiple, los anticuerpos se pueden utilizar en combinación con los fármacos inmunosupresores adecuados, incluyendo, pero no limitándose a, metotrexato, ciclofosfamida, mizoribina, clorambucil, ciclosporina, tacrolimus (FK506; PROGRAFTM), micofenolato-mofetil, y azatioprina (6-mercaptopurina), sirolimus (rapamicina), desoxiespergualina, leflunomida y sus análogos de malono-nitrilo-amida; y proteínas inmunosupresoras, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos y fusiones de Ig anti-CTLA, anticuerpos estimulantes anti-linfocitos-B (por ejemplo, LYMPHOSTAT-BTM), y fusiones de Ig (BlyS-Ig), anticuerpos anti-CD20 (por ejemplo, RITUXAN (D); el anticuerpo completamente humano HuMax-CD20, R-1594, IMMIJ-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/1-131, tositumomab (Bexxar (RTM)), ibritumomab-tiuxetano (Zevalin (RTM)); anticuerpos anti-CD80, y etanorcept (ENBREL), así como anticuerpos anti-células T, tales como anti-CD3 (OKT3), anti-CD4, los agentes involucrados en la modulación de los receptores S1P, incluyendo, por ejemplo, fingolimod; y similares.

Formulaciones farmacéuticas y modos de administración

Los anticuerpos o las proteínas anti-CD40 de esta divulgación se administran en una concentración que es terapéuticamente efectiva para prevenir o tratar las enfermedades autoinmunes y/o las enfermedades inflamatorias, y/o para prevenir o reducir los riesgos asociados con rechazo de injerto en el trasplante.

Para alcanzar esta meta, los anticuerpos se pueden formular utilizando una variedad de excipientes aceptables conocidos en la técnica. Típicamente, los anticuerpos o las proteínas se administran mediante inyección, por ejemplo, ya sea intravenosamente, intraperitonealmente, o subcutáneamente. Los métodos para llevar a cabo esta administración son conocidos por aquéllos de una experiencia ordinaria en este campo. También es posible obtener composiciones que se puedan administrar tópicamente u oralmente, o las cuales se puedan transmitir a través de las membranas mucosas.

La administración intravenosa se presenta de preferencia mediante infusión durante un período de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 horas, más preferiblemente durante aproximadamente 1 a aproximadamente 8 horas, todavía más preferiblemente durante aproximadamente 2 a aproximadamente 7 horas, todavía más preferiblemente durante aproximadamente 4 a aproximadamente 6 horas, dependiendo del anticuerpo o de la proteína anti-CD40 que se esté administrando. La infusión inicial con la composición farmacéutica se puede dar durante un período de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 horas, suministrándose las siguientes infusiones más rápidamente. Las siguientes infusiones se pueden administrar durante un período de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 horas, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 horas, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 horas, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 horas.

Una composición farmacéutica de la divulgación se formula para ser compatible con su vía de administración pretendida. Los ejemplos de las posibles vías de administración incluyen administración parenteral, (por ejemplo, intravenosa (IV), intramuscular (IM), intradérmica, subcutánea (SC), o infusión), oral y pulmonar (por ejemplo, inhalación), nasal, transdérmica (tópica), transmucosal, y rectal. Las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril, tal como agua para inyecciones, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metil-parabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes, tales como ácido etilen-diamina-tetra-acético; reguladores, tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede alojar en ampollitas, jeringas desechables, o frascos de múltiples dosis hechos de vidrio o de plástico.

Los anticuerpos o las proteínas anti-CD40 de la divulgación se proporcionan típicamente mediante las técnicas convencionales dentro de un regulador farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, solución salina estéril, agua regulada estéril, propilenglicol, combinaciones de los anteriores, etc. Los métodos para la preparación de los agentes parenteralmente administrables se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (18ª Edición; Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania, 1990). Véase también, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 98/56418, la cual describe formulaciones farmacéuticas de anticuerpos estabilizados adecuadas para utilizarse en los métodos de la presente divulgación.

La cantidad de al menos un anticuerpo o una proteína antagonista anti-CD40 de la divulgación para administrarse es fácilmente determinada por un experto ordinario en este campo. Los factores que tienen influencia sobre el modo de administración y la cantidad respectiva de al menos un anticuerpo o una proteína antagonista anti-CD40 incluyen, pero no se limitan a, la enfermedad particular que se someta a terapia, la gravedad de la enfermedad, la historia de la enfermedad, y la edad, altura, peso, salud, y condición física del individuo que se someta a terapia. De una

manera similar, la cantidad de anticuerpo o proteína antagonista anti-CD40 para administrarse dependerá del modo de administración y si el sujeto se someterá a una sola dosis o múltiples dosis de este agente. En términos generales, se prefiere una dosificación más alta del anticuerpo o de la proteína anti-CD40 con un peso creciente del paciente que se someta a terapia. La dosis del anticuerpo o de la proteína anti-CD40 para administrarse está en el intervalo de aproximadamente 0.003 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de preferencia en el intervalo de 0.01 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg.

Por consiguiente, por ejemplo, la dosis puede ser de 0.01 mg/kg, de 0.03 mg/kg, de 0.1 mg/kg, de 0.3 mg/kg, de 0.5 mg/kg, de 1 mg/kg, de 1.5 mg/kg, de 2 mg/kg, de 2.5 mg/kg, de 3 mg/kg, de 5 mg/kg, de 7 mg/kg, de 10 mg/kg, de 15 mg/kg, de 20 mg/kg, de 25 mg/kg, de 30 mg/kg, de 35 mg/kg, de 40 mg/kg, de 45 mg/kg, o de 50 mg/kg.

En otra realización de la divulgación, el método comprende la administración de múltiples dosis del anticuerpo antagonista anti-CD40, o de un fragmento del mismo. El método puede comprender la administración de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, o más dosis terapéuticamente efectivas de una composición farmacéutica, las cuales comprenden un anticuerpo antagonista anti-CD40, o un fragmento del mismo. La frecuencia y la duración de administración de múltiples dosis de las composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo o la proteína anti-CD40 pueden ser fácilmente determinadas por un experto en la técnica. Más aún, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo o de una proteína puede incluir un solo tratamiento o, de preferencia, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, un sujeto se trata con el anticuerpo o la proteína antagonista anti-CD40 de la divulgación, en el intervalo de entre aproximadamente 0.1 a 20 mg/kg de peso corporal, una vez por semana durante entre aproximadamente 1 y 10 semanas, de preferencia de entre aproximadamente 2 y 8 semanas, más preferiblemente de entre aproximadamente 3 y 7 semanas, y todavía más preferiblemente durante aproximadamente 4, 5, o 6 semanas. El tratamiento se puede presentar anualmente para prevenir la recurrencia o al indicarse la recurrencia. También se apreciará que la dosificación efectiva del anticuerpo o del fragmento de enlace de antígeno del mismo utilizada para el tratamiento, puede aumentar o disminuir durante el transcurso de un tratamiento particular. Los cambios en la dosificación pueden resultar y llegar a ser evidentes a partir de los resultados de los ensayos de diagnóstico, como se describen en la presente.

Por consiguiente, en una realización, el régimen de dosificación incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente efectiva de al menos un anticuerpo o una proteína anti-CD40 de la divulgación en los días 1, 7, 14, y 21 del período de tratamiento. En otra realización, el régimen de dosificación incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente efectiva de al menos un anticuerpo o una proteína anti-CD40 de la divulgación en los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, y 7 de una semana en el período de tratamiento. Otras realizaciones incluyen un régimen de dosificación que tiene una primera administración de una dosis terapéuticamente efectiva de al menos un anticuerpo o una proteína anti-CD40 de la divulgación en los días 1, 3, 5, y 7 de una semana en el período de tratamiento; un régimen de dosificación que incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente efectiva de al menos un anticuerpo o una proteína anti-CD40 de la divulgación en los días 1 y 3 de una semana en el período de tratamiento; y un régimen de dosificación preferido que incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente efectiva de al menos un anticuerpo o una proteína anti-CD40 de la divulgación en el día 1 de una semana en el período de tratamiento. El período de tratamiento puede comprender 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, un mes, 3 meses, 6 meses, o un año. Los períodos de tratamiento pueden ser subsiguientes o se pueden separar unos de otros por un día, una semana, 2 semanas, un mes, 3 meses, 6 meses, o un año, en intervalos de 0.003 mg/kg a 50 mg/kg, de 0.01 mg/kg a 40 mg/kg, de 0.01 mg/kg a 30 mg/kg, de 0.1 mg/kg a 30 mg/kg, de 0.5 mg/kg a 30 mg/kg, de 1 mg/kg a 30 mg/kg, de 3 mg/kg a 30 mg/kg, de 3 mg/kg a 25 mg/kg, de 3 mg/kg a 20 mg/kg, de 5 mg/kg a 15 mg/kg, o de 7 mg/kg a 12 mg/kg. Por consiguiente, por ejemplo, la dosis de cualquier anticuerpo antagonista anti-CD40, o fragmento de enlace de antígeno del mismo, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal o la proteína anti-CD40 de la divulgación, puede ser de 0.003 mg/kg, de 0.01 mg/kg, de 0.03 mg/kg, de 0.1 mg/kg, de 0.3 mg/kg, de 0.5 mg/kg, de 1 miligramo/ kilogramo, de 1.5 mg/kg, de 2 mg/kg, de 2.5 mg/kg, de 3 mg/kg, de 5 mg/kg, de 7 mg/kg, de 10 mg/kg, de 15 mg/kg, de 20 mg/kg, de 25 mg/kg, de 30 mg/kg, de 35 mg/kg, de 40 mg/kg, de 45 mg/kg, de 50 mg/kg, u otras dosis que caigan dentro del intervalo de 0.003 mg/kg a 50 mg/kg. Se puede administrar la misma dosis terapéuticamente efectiva de un anticuerpo o de una proteína anti-CD40 de la divulgación a través de cada semana de dosificación del anticuerpo.

De una manera alternativa, se pueden utilizar diferentes dosis terapéuticamente efectivas de un anticuerpo o de una proteína antagonista anti-CD40 de la divulgación durante el transcurso del período de tratamiento.

En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente efectiva inicial de un anticuerpo antagonista anti-CD40, o de un fragmento de enlace de antígeno del mismo, como se define en cualquier otra parte en la presente, puede estar en el intervalo de dosificación más bajo (es decir, de 0.003 mg/kg a 20 mg/kg), cayendo las siguientes dosis dentro del intervalo de dosificación más alto (es decir, de 20 mg/kg a 50 mg/kg).

En las realizaciones alternativas, la dosis terapéuticamente efectiva inicial de un anticuerpo antagonista anti-CD40, o de un fragmento de enlace de antígeno del mismo, como se define en cualquier otra parte en la presente, puede estar en el intervalo de dosificación superior (es decir, de 20 mg/kg a 50 mg/kg), cayendo las siguientes dosis dentro del intervalo de dosificación más bajo (es decir, de 0.003 mg/kg a 20 mg/kg). Por consiguiente, en una realización, la dosis terapéuticamente efectiva inicial del anticuerpo antagonista anti-CD40, o fragmento de enlace de antígeno del mismo, es de 20 mg/kg a 35 mg/kg, incluyendo aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg,

aproximadamente 30 mg/kg, y aproximadamente 35 mg/kg, y las siguientes dosis terapéuticamente efectivas del anticuerpo o de la proteína antagonista anti-CD40 de la divulgación son de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, incluyendo aproximadamente 5 mg/kg, 8 mg/kg, 10 mg/kg, 12 mg/kg, y aproximadamente 15 mg/kg.

5 En algunas realizaciones de la divulgación, la terapia anti-CD40 se inicia mediante la administración de una "dosis de carga" del anticuerpo o de la proteína de la divulgación al sujeto que necesite la terapia anti-CD40. "Dosis de carga" significa una dosis inicial del anticuerpo o de la proteína anti-CD40 de la divulgación que se administra al sujeto, en donde la dosis del anticuerpo o de la proteína de la divulgación administrada cae dentro del intervalo de dosificación más alto (es decir, de aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg). La "dosis de carga" se puede administrar como una sola administración, por ejemplo, una sola infusión, en donde el anticuerpo o el fragmento de enlace de antígeno del mismo, se administra intravenosamente (iv), o como múltiples administraciones, por ejemplo, múltiples infusiones, en donde el anticuerpo o el fragmento de enlace de antígeno del mismo se administra intravenosamente (iv), siempre que se administre la "dosis de carga" completa dentro de un período de aproximadamente 24 horas. En seguida de la administración de la "dosis de carga", se administra entonces al sujeto una o más dosis terapéuticamente efectivas adicionales del anticuerpo o de la proteína anti-CD40 de la divulgación. Las siguientes dosis terapéuticamente efectivas se pueden administrar, por ejemplo, de acuerdo con un programa de dosificación semanal, o una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, o una vez cada cuatro semanas. En estas realizaciones, las siguientes dosis terapéuticamente efectivas caen en general dentro del intervalo de dosificación más bajo (es decir, de 0.003 mg/kg a 20 mg/kg).

20 De una manera alternativa, en algunas realizaciones, en seguida de la "dosis de carga", se administran las siguientes dosis terapéuticamente efectivas del anticuerpo o de la proteína anti-CD40 de la divulgación, de acuerdo con un "programa de mantenimiento", en donde la dosis terapéuticamente efectiva del anticuerpo o de la proteína de la divulgación se administra una vez al mes, una vez cada 6 semanas, una vez cada dos meses, una vez cada 10 semanas, una vez cada tres meses, una vez cada 14 semanas, una vez cada cuatro meses, una vez cada 18 semanas, una vez cada cinco meses, una vez cada 22 semanas, una vez cada 6 meses, una vez cada 7 meses, una vez cada 8 meses, una vez cada 9 meses, una vez cada 10 meses, una vez cada 11 meses, o una vez cada 12 meses. En estas realizaciones, las dosis terapéuticamente efectivas del anticuerpo o de la proteína anti-CD40 de la divulgación caen dentro del intervalo de dosificación más bajo (es decir, de 0.003 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg), en particular, cuando las siguientes dosis se administran a intervalos más frecuentes, por ejemplo, desde una vez cada dos semanas hasta una vez cada mes, o dentro del intervalo de dosificación más alto (es decir, de 20 mg/kg a 50 mg/kg), en particular, cuando las siguientes dosis se administran a intervalos menos frecuentes, por ejemplo, en donde las siguientes dosis se administran con una separación de un mes a 12 meses.

En los métodos de la divulgación se puede utilizar cualquier composición farmacéutica que comprenda un anticuerpo o una proteína anti-CD40 de la divulgación, que tenga las propiedades funcionales deseadas descritas en la presente, como el componente terapéuticamente activo. Por consiguiente, las composiciones líquidas, liofilizadas, o secadas por aspersion que comprendan uno o más de los anticuerpos o de las proteínas anti-CD40 de la divulgación, por ejemplo, el anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3s, se pueden preparar como una solución o suspensión acuosa o no acuosa para su administración subsiguiente a un sujeto de acuerdo con los métodos de la divulgación.

40 Cada una de estas composiciones comprenderá al menos uno de los anticuerpos o de las proteínas anti-CD40 de la presente divulgación como un componente terapéuticamente o profilácticamente activo.

"Componente terapéuticamente o profilácticamente activo" significa que el anticuerpo o la proteína anti-CD40 de la divulgación se incorpora específicamente dentro de la composición para provocar una respuesta terapéutica o profiláctica deseada con respecto al tratamiento, la prevención, o el diagnóstico de una enfermedad o condición en un sujeto, cuando la composición farmacéutica se administra a ese sujeto. De preferencia, las composiciones farmacéuticas comprenden agentes estabilizantes apropiados, agentes de volumen, o ambos, para minimizar los problemas asociados con la pérdida de estabilidad y actividad biológica de la proteína durante su preparación y almacenamiento.

Se pueden agregar formulantes a las composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo o una proteína anti-CD40 de la divulgación. Estos formulantes pueden incluir, pero no se limitan a, aceites, polímeros, vitaminas, carbohidratos, aminoácidos, sales, reguladores, albúmina, tensoactivos, o agentes de volumen. De preferencia, los carbohidratos incluyen azúcar o alcoholes de azúcar, tales como mono-, di-, o poli-sacáridos, o glucanos solubles en agua. Los sacáridos o glucanos pueden incluir fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, sacarosa, dextrano, pululano, dextrina, α - y β -ciclodextrina, almidón soluble, almidón de hidroxietilo, y carboxi-metil-celulosa, o mezclas de los mismos.

55 "Alcohol de azúcar" se define como un hidrocarburo de 4 a 8 átomos de carbono que tiene un grupo hidroxilo e incluye galactitol, inositol, manitol, xilitol, sorbitol, glicerol, y arabitol. Estos azúcares o alcoholes de azúcar se pueden utilizar individualmente o en combinación. La concentración de azúcar o de alcohol de azúcar puede ser de entre el 1.0 % y el 7 % en peso/volumen, más preferiblemente de entre el 2.0 % y el 6.0 % en peso/volumen. Por ejemplo, los aminoácidos incluyen las formas levóginas (L) de carnitina, arginina, y betaína; sin embargo, se pueden agregar otros aminoácidos. Los polímeros preferidos incluyen polivinil-pirrolidona (PVP) con un peso molecular

promedio de entre 2,000 y 3,000, o polietilenglicol (PEG) con un peso molecular promedio de entre 3,000 y 5,000. Los tensoactivos que se pueden agregar a la formulación se muestran en las Patentes Europeas Números 270,799 y 268,110.

5 Adicionalmente, los anticuerpos se pueden modificar químicamente mediante la conjugación covalente con un polímero para aumentar su vida media circulante, por ejemplo. Los polímeros preferidos, y los métodos para unirlos a los péptidos, se muestran en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 4,766,106; 4,179,337; 4,495,285; y 4,609,546. Los polímeros preferidos son los polioles polioxietilados y polietilenglicol (PEG). El PEG es soluble en agua a temperatura ambiente, y tiene la fórmula general: R (O--CH₂--CH₂)_nO--R, en donde R puede ser hidrógeno, o un grupo protector, tal como un grupo alquilo o alcohol. De preferencia, el grupo protector tiene entre 1 y 8 átomos de carbono, más preferiblemente es metilo. El símbolo n es un entero positivo, de preferencia de entre 1 y 1,000, más preferiblemente de entre 2 y 500. El PEG tiene un peso molecular promedio preferido de entre 1,000 y 40,000, más preferiblemente de entre 2,000 y 20,000, más preferiblemente de entre 3,000 y 12,000. De preferencia, el PEG tiene al menos un grupo hidroxilo, más preferiblemente es un grupo hidroxilo terminal. Es este grupo hidroxilo el que se activa de preferencia para reaccionar con un grupo amino libre sobre el inhibidor. Sin embargo, se entenderá que el tipo y la cantidad de los grupos reactivos se pueden variar para lograr un PEG/anticuerpo covalentemente conjugado de la presente divulgación.

Los polioles polioxietilados solubles en agua también son útiles en la presente divulgación.

20 Incluyen sorbitol polioxietilado, glucosa polioxietilada, glicerol polioxietilado (POG), y similares. Se prefiere el glicerol polioxietilado (POG). Una razón es debido a que la estructura base de glicerol del glicerol polioxietilado es la misma estructura base que se presenta naturalmente, por ejemplo, en los animales y en los seres humanos, en los mono-, di-, tri-glicéridos. Por consiguiente, esta ramificación no se vería necesariamente como un agente extraño en el cuerpo. El glicerol polioxietilado (POG) tiene un peso molecular preferido en el mismo intervalo que el PEG. La estructura para el glicerol polioxietilado (POG) se muestra en Knauf y colaboradores (1988, J. Bio. Chem. 263: 15064-15070), y se encuentra una discusión de los conjugados de POG/IL-2 en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,766, 106.

Otro sistema de suministro de fármacos para aumentar la vida media circulante es el liposoma.

30 Los métodos para la preparación de sistemas de suministro de liposomas se discuten en Gabizon y colaboradores (1982) Cancer Research 42: 4734; Cafiso (1981) Biochem Biophys Acta 649: 129; y Szoka (1980) Ann. Rev. Biophys. Eng. 9: 467. Otros sistemas de suministro de fármacos se conocen en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Poznansky y colaboradores (1980) Drug Delivery Systems (R. L. Juliano, Editor, Oxford, N. Y.) páginas 253-315; Poznansky (1984) Pharm Revs 36: 277.

35 El formulante para incorporarse en una composición farmacéutica debe proporcionar la estabilidad del anticuerpo o de la proteína antagonista anti-CD40 de la divulgación. Es decir, el anticuerpo o la proteína anti-CD40 de la divulgación debe conservar su estabilidad física y/o química, y debe tener las propiedades funcionales deseadas, es decir, una o más de las propiedades funcionales deseadas definidas anteriormente en la presente.

40 Los métodos para monitorizar la estabilidad de la proteína son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Jones (1993) Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90; Lee, Editor, (1991) Peptide and Protein Drug Delivery (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Nueva York); y los ensayos de estabilidad que se dan a conocer en la presente más adelante. En términos generales, la estabilidad de la proteína se mide a una temperatura seleccionada durante un período de tiempo especificado. En las realizaciones preferidas, una formulación farmacéutica de anticuerpo estable proporciona la estabilidad del anticuerpo o de la proteína antagonista anti-CD40 de la divulgación cuando se almacena a temperatura ambiente (a aproximadamente 25 °C) durante al menos 1 mes, al menos 3 meses, o al menos 6 meses, y/o es estable a aproximadamente 2-8 °C durante al menos 6 meses, al menos 9 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, o al menos 24 meses.

45 Una proteína, tal como un anticuerpo, cuando se formula en una composición farmacéutica, se considera que conserva su estabilidad física en un punto del tiempo dado si no muestra signos visuales (es decir, decoloración o pérdida de claridad) o muestra signos mensurables (por ejemplo, utilizando cromatografía por exclusión de tamaños (SEC) o dispersión de luz ultravioleta (UV)) de precipitación, aglomeración, y/o desnaturalización en esa composición farmacéutica. Con respecto a la estabilidad química, una proteína, tal como un anticuerpo, cuando se formula en una composición farmacéutica, se considera que conserva su estabilidad química en un punto del tiempo dado si las mediciones de la estabilidad química indican que la proteína (es decir, el anticuerpo) conserva la actividad biológica de interés en esa composición farmacéutica. Los métodos para monitorizar los cambios en la estabilidad química son bien conocidos en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, los métodos para detectar las formas químicamente alteradas de la proteína, tales como resultan de la sujeción, utilizando, por ejemplo, SDS-PAGE, SEC, y/o ionización con desorción de láser asistida por matriz/espectrometría de masas con tiempo de vuelo; y la degradación asociada con los cambios en la carga molecular (por ejemplo, asociada con la desamidación), utilizando, por ejemplo, cromatografía de intercambio de iones. Véanse, por ejemplo, los métodos que se dan a conocer en la presente más adelante.

Un anticuerpo o una proteína anti-CD40 de la divulgación, cuando se formula en una composición farmacéutica, se considera que conserva una actividad biológica deseada en un punto del tiempo dado, si la actividad biológica deseada en ese tiempo está dentro de aproximadamente el 30 %, de preferencia dentro de aproximadamente el 20 % de la actividad biológica deseada exhibida en el momento en que se preparó la composición farmacéutica, como se determine en un ensayo adecuado para determinar la actividad biológica deseada. Los ensayos para medir la actividad biológica deseada de los anticuerpos o proteínas antagonistas anti-CD40 que se dan a conocer en la presente, se pueden llevar a cabo como se describe en los Ejemplos en la presente. Véanse también los ensayos descritos en Schutze y colaboradores (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 92: 8200-8204; Denton y colaboradores (1998) *Pediatr Transplant.* 2: 6-15; Evans y colaboradores (2000) *J : Immunol.* 164: 688-697; Noelle (1998) *Agents Actions*, Suplemento 49: 17-22; Lederman y colaboradores (1996) *Curr Opin. Hematol.* 3: 77-86; Coligan y colaboradores (1991) *Current Protocols in Immunology* 13: 12; Kwekkeboom y colaboradores (1993) *Immunology* 79: 439-444; y Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5,674, 492 y 5,847, 082.

En algunas realizaciones de la divulgación, el anticuerpo anti-CD40, por ejemplo, seleccionado entre los anticuerpos recombinantes mAb1-mAb3, se formula en una formulación farmacéutica líquida. El anticuerpo o la proteína anti-CD40 de la divulgación se puede preparar empleando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo los métodos que se dan a conocer anteriormente en la presente. En una realización, el anticuerpo anti-CD40, por ejemplo, seleccionado entre los anticuerpos mAb1-mAb3, se produce de una manera recombinante en una línea celular CHO.

En seguida de su preparación y purificación, el anticuerpo anti-CD40 se puede formular como una formulación farmacéutica líquida en la manera estipulada en la presente. Cuando el anticuerpo antagonista anti-CD40 se va a almacenar antes de su formulación, se puede congelar, por ejemplo, a -20 °C, y entonces se descongela a temperatura ambiente para su formulación adicional.

La formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o de la proteína anti-CD40 de la divulgación, por ejemplo, el anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3. La cantidad de anticuerpo presente en la formulación toma en consideración la vía de administración y el volumen de dosis deseado.

De esta manera, la composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3, en una concentración de 0.1 miligramos/mililitro a 300.0 miligramos/mililitro, de 1.0 miligramos/ mililitro a 200 miligramos/mililitro, de 5.0 miligramos/mililitro a 100.0 miligramos/mililitro, de 7.5 miligramos/mililitro a 50 miligramos/ mililitro, o de 15.0 miligramos/mililitro a 25.0 miligramos/mililitro.

La composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3, y un regulador que mantenga el pH de la formulación en el intervalo de un pH de 5.0 a un pH de 7.0.

En la formulación se puede utilizar cualquier regulador adecuado que mantenga el pH de la formulación de anticuerpo anti-CD40 líquida en el intervalo de aproximadamente un pH de 5.0 a aproximadamente un pH de 7.0, siempre que se conserven la estabilidad físico-química y la actividad biológica deseadas del anticuerpo, como se observa anteriormente en la presente. Los reguladores adecuados incluyen, pero no se limitan a, los ácidos convencionales y las sales de los mismos, en donde el contra-ion puede ser, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio, o magnesio. Los ejemplos de los ácidos convencionales y las sales de los mismos que se pueden utilizar para regular la formulación farmacéutica líquida incluyen, pero no se limitan a, los reguladores de ácido succínico o succinato, histidina o clorhidrato de histidina, ácido cítrico o citrato, ácido acético o acetato, ácido tartárico o tartrato, ácido fosfórico o fosfato, ácido glucónico o gluconato, ácido glutámico o glutamato, ácido aspártico o aspartato, ácido maleico o maleato, y ácido málico o malato. La concentración del regulador dentro de la formulación puede ser de 1 mM a 50 mM, incluyendo de aproximadamente 1 mM, 2 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, u otros valores dentro del intervalo de 1 mM a 50 mM.

En algunas realizaciones de la divulgación, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3, y regulador de succinato o regulador de citrato o regulador de histidina o regulador de clorhidrato de histidina, en una concentración que mantenga el pH de la formulación en el intervalo de aproximadamente un pH de 5.0 a un pH de 7.0. "Regulador de succinato" o "regulador de citrato" significa un regulador que comprende una sal de ácido succínico o una sal de ácido cítrico, respectivamente. "Regulador de histidina" significa un regulador que comprende una sal del aminoácido histidina.

En una realización preferida, el regulador es un regulador de histidina, por ejemplo, clorhidrato de histidina. Como se observa anteriormente, la concentración del regulador de histidina dentro de la formulación puede ser de 1 mM a 50 mM, incluyendo de aproximadamente 1 mM, 2 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, u otros valores dentro del intervalo de 1 mM a 50 mM.

En una realización preferida, el contra-ion de succinato o citrato es el catión de sodio, y, por consiguiente, el regulador es succinato de sodio o citrato de sodio, respectivamente. Sin embargo, se espera que sea efectivo cualquier catión. Otros posibles cationes de succinato o citrato incluyen, pero no se limitan a, potasio, amonio, calcio, y magnesio. Como se observa anteriormente, la concentración del regulador de succinato o citrato dentro de la

formulación puede ser de 1 mM a 50 mM, incluyendo de aproximadamente 1 mM, 2 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, u otros valores dentro del intervalo de 1 mM a 50 mM.

En otras realizaciones, la formulación farmacéutica líquida comprende el anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3, en una concentración de 0.1 miligramos/mililitro a 300.0 miligramos/mililitro, o de 1.0 miligramos/ mililitro a 200 miligramos/mililitro, de 5.0 miligramos/mililitro a 100.0 miligramos/mililitro, de 7.5 miligramos/mililitro a 50 miligramos/ mililitro, o de 15.0 miligramos/mililitro a 25.0 miligramos/mililitro, y el regulador de histidina o succinato o citrato, por ejemplo, el regulador de succinato de sodio o citrato de sodio o clorhidrato de histidina, en una concentración de 1 mM a 50 mM, de 5 mM a 40 mM, de 10mM a 35 mM, de preferencia de aproximadamente 30 mM.

10 Cuando sea deseable que la formulación farmacéutica líquida sea casi isotónica, la formulación farmacéutica líquida que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o de la proteína anti-CD40 de la divulgación, por ejemplo, el anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3, y un regulador para mantener el pH de la formulación dentro del intervalo de aproximadamente un pH de 5.0 a aproximadamente un pH de 7.0, puede comprender además una cantidad de un agente isotonizante suficiente para hacer que la formulación sea casi isotónica. "Casi isotónica" significa que la formulación acuosa tiene una osmolaridad de 240 mmol/kg a 800 mmol/kg, de preferencia de aproximadamente 240 a aproximadamente 600 mmol/kg, más preferiblemente de aproximadamente 240 a aproximadamente 440 mmol/kg, más preferiblemente de aproximadamente 250 a aproximadamente 330 mmol/kg, todavía más preferiblemente de aproximadamente 260 a aproximadamente 320 mmol/kg, todavía más preferiblemente de aproximadamente 270 a aproximadamente 310 mmol/kg.

20 Los métodos para determinar la isotonicidad de una solución son conocidos por los expertos en este campo. Véase, por ejemplo, Setnikar y colaboradores (1959) J. Am. Pharm. Assoc. 48: 628. Los expertos en este campo están familiarizados con una variedad de solutos farmacéuticamente aceptables útiles para proporcionar isotonicidad a las composiciones farmacéuticas. El agente isotonizante puede ser cualquier reactivo capaz de ajustar la presión osmótica de la formulación farmacéutica líquida de la presente divulgación, hasta un valor casi igual a aquél de un fluido corporal. Es deseable utilizar un agente isotonizante fisiológicamente aceptable.

30 Por consiguiente, la formulación farmacéutica líquida que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3, y un regulador para mantener el pH de la formulación dentro del intervalo de aproximadamente un pH de 5.0 a aproximadamente un pH de 7.0, puede comprender además componentes que se puedan utilizar para proporcionar isotonicidad, por ejemplo, cloruro de sodio; aminoácidos, tales como alanina, valina, y glicina; azúcares y alcoholes de azúcar (polioles), incluyendo, pero no limitándose a, glucosa, dextrosa, fructosa, sacarosa, maltosa, manitol, trehalosa, glicerol, sorbitol, y xilitol; ácido acético, otros ácidos orgánicos o sus sales, y cantidades relativamente menores de citratos o fosfatos. La persona experta ordinaria sabría de agentes adicionales que sean adecuados para proporcionar la tonicidad óptima a la formulación líquida.

35 En algunas realizaciones preferidas, la formulación farmacéutica líquida que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3, y un regulador para mantener el pH de la formulación dentro del intervalo de aproximadamente un pH de 5.0 a aproximadamente un pH de 7.0, comprende además cloruro de sodio como el agente isotonizante.

40 La concentración de cloruro de sodio en la formulación dependerá de la contribución de otros componentes a la tonicidad. En algunas realizaciones, la concentración de cloruro de sodio es de 50 mM a 300 mM. En una realización, la concentración de cloruro de sodio es de aproximadamente 150 mM. En otras realizaciones, la concentración de cloruro de sodio es de aproximadamente 150 mM, el regulador es el regulador de succinato de sodio o citrato de sodio en una concentración de 5 mM a 15 mM, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o de la proteína anti-CD40 de la divulgación, por ejemplo, el anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3, y la formulación tiene un pH de 5.0 a un pH de 7.0.

50 En otras realizaciones, la formulación farmacéutica líquida comprende el anticuerpo o la proteína anti-CD40 de la divulgación, por ejemplo, el anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3, en una concentración de 0.1 miligramos/mililitro a 50.0 miligramos/mililitro o de 5.0 miligramos/mililitro a 25.0 miligramos/mililitro, aproximadamente 150 mM de cloruro de sodio, y aproximadamente 10 mM, 20 mM 30 mM, 40 mM o 50 mM de succinato de sodio o citrato de sodio, a un pH de aproximadamente un pH de 5.5.

55 La degradación de la proteína debido a la congelación/ descongelación o al desgarre mecánico durante el procesamiento de una formulación farmacéutica líquida de la presente divulgación, se puede inhibir mediante la incorporación de tensoactivos dentro de la formulación, con el objeto de bajar la tensión superficial en la interfase de solución-aire. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o de la proteína anti-CD40 de la divulgación, por ejemplo, el anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3, un regulador para mantener el pH de la formulación dentro del intervalo de aproximadamente un pH de 5.0 a aproximadamente un pH de 7.0, y comprende además un tensoactivo. En otras realizaciones, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o de la proteína anti-CD40 de la divulgación, por ejemplo, el anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3, un regulador para

mantener el pH de la formulación dentro del intervalo de aproximadamente un pH de 5.0 a aproximadamente un pH de 7.0, un agente isotonzante, tal como cloruro de sodio, en una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM, y comprende además un tensoactivo.

5 Los tensoactivos típicos empleados son tensoactivos no iónicos, incluyendo ésteres de sorbitol de polioxietileno, tales como polisorbato 80 (Tween 80), y polisorbato 20 (Tween 20); ésteres de polioxipropileno-polioxietileno, tales como Pluronic F68; alcoholes de polioxietileno, tales como Brij 35; simeticona; polietilenglicol, tal como PEG400; lisofosfatidil-colina; y polioxietileno-p-t-octilfenol, tal como Triton X-100.

10 La estabilización clásica de los productos farmacéuticos mediante tensoactivos o emulsionantes se describe, por ejemplo, en Levine y colaboradores (1991) *J. Parenteral Sci. Technol.* 45 (3): 160-165, incorporado a la presente como referencia. Un tensoactivo preferido empleado en la práctica de la presente divulgación es polisorbato 80. Cuando se incluye un tensoactivo, típicamente se agrega en una cantidad del 0.001 % al 1.0 % (peso/volumen).

15 Por consiguiente, en algunas realizaciones, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o de la proteína anti-CD40 de la divulgación, por ejemplo, el anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3, el regulador es succinato de sodio o citrato de sodio o regulador de histidina o regulador de clorhidrato de histidina, en una concentración de 1 mM a 50 mM, de 3 mM a 40 mM, o de 5 mM a 35 mM; o de 7.5 mM a 30mM; la formulación tiene un pH de un pH de 5.0 a un pH de 7.0; y la formulación comprende además un tensoactivo, por ejemplo, polisorbato 80, en una cantidad del 0.001 % al 1.0 %, o del 0.001 % al 0.5 %. Estas formulaciones opcionalmente pueden comprender un agente isotonzante, tal como cloruro de sodio, en una concentración de 50 mM a 300 mM, de 50mM a 200 mM, o de 50 mM a 150 mM.

20 En otras realizaciones, la formulación farmacéutica líquida comprende el anticuerpo o la proteína anti-CD40 de la divulgación, por ejemplo, el anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3, en una concentración de 0.1 miligramos/mililitro a 200.0 miligramos/mililitro, o de 1 miligramo/mililitro a 100.0 miligramos/mililitro, o de 2 miligramos/ mililitro a 50.0 miligramos/mililitro, o de 5.0 miligramos/mililitro a 25.0 miligramos/mililitro, incluyendo de aproximadamente 20.0 miligramos/mililitro; de 50 mM a 200 mM de cloruro de sodio, incluyendo aproximadamente 150 mM de cloruro de sodio; succinato de sodio o citrato de sodio de 5 mM a 20 mM, incluyendo aproximadamente 10 mM de succinato de sodio o citrato de sodio; cloruro de sodio en una concentración de 50 mM a 200 mM, incluyendo aproximadamente 150 mM; histidina o cloruro de histidina de 5 mM a 50 mM, incluyendo aproximadamente 30 mM de histidina o cloruro de histidina; y opcionalmente un tensoactivo, por ejemplo, polisorbato 80, en una cantidad del 0.001 % al 1.0 %, incluyendo del 0.001 % al 0.5 %; en donde la formulación farmacéutica líquida tiene un pH de aproximadamente un pH de 5.0 a aproximadamente un pH de 7.0.

30 La formulación farmacéutica líquida puede estar esencialmente libre de cualesquiera conservadores y otros vehículos, excipientes, o estabilizantes observados anteriormente en la presente. De una manera alternativa, la formulación puede incluir uno o más conservadores, por ejemplo, agentes antibacterianos, vehículos farmacéuticamente aceptables, excipientes, o estabilizantes descritos anteriormente en la presente, en el entendido de que no afecten adversamente la estabilidad físico-química del anticuerpo antagonista anti-CD40 o fragmento de enlace de antígeno del mismo. Los ejemplos de los vehículos, excipientes, y estabilizantes aceptables incluyen, pero no se limitan a, agentes reguladores adicionales, co-solventes, tensoactivos, antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina, agentes quelantes, tales como EDTA, complejos de metales (por ejemplo, complejos de Zn-proteína), y polímeros biodegradables, tales como poliésteres. Se puede encontrar una discusión completa de la formulación y selección de los vehículos, estabilizantes, e isotonzantes farmacéuticamente aceptables, en Remington's Pharmaceutical Sciences (18ª Edición; Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania, 1990).

35 Después de que se prepara la formulación farmacéutica líquida u otra composición farmacéutica descrita en la presente, se puede liofilizar para prevenir la degradación. Los métodos para liofilizar las composiciones líquidas son conocidos por aquéllos de una experiencia ordinaria en este campo. Justo antes de usarse, la composición se puede reconstituir con un diluyente estéril (solución de Ringer, agua destilada, o solución salina estéril, por ejemplo), el cual puede incluir ingredientes adicionales.

45 Después de la reconstitución, la composición de preferencia se administra a los sujetos empleando los métodos que son conocidos por los expertos en este campo.

Uso de los anticuerpos antagonistas anti-CD40 en la elaboración de medicamentos

50 La presente divulgación también proporciona los anticuerpos o las proteínas antagonistas anti-CD40 de la divulgación, para utilizarse en el tratamiento de una enfermedad autoinmune y/o de una enfermedad inflamatoria en un sujeto, en donde el medicamento se coordina con un tratamiento con al menos otra terapia.

55 "Se coordina" significa que el medicamento es para utilizarse ya sea antes, durante, o después del tratamiento del sujeto con al menos otra terapia. Los ejemplos de otras terapias incluyen, pero no se limitan a, aquéllas descritas anteriormente en la presente, es decir, cirugía o procedimientos quirúrgicos (por ejemplo, esplenectomía, linfadenectomía, tiroidectomía, plasmaforesis, leucoforesis, trasplante de células, tejidos, u órganos, perfusión de órgano, procedimientos intestinales, y similares), terapia de radiación, terapia tal como terapia esteroidea y terapia no esteroidea, terapia de hormonas, terapia de citoquina, terapia con agentes dermatológicos (por ejemplo, agentes

5 tópicos utilizados para tratar condiciones de la piel, tales como alergias, dermatitis por contacto, y soriasis), terapia inmunosupresora, y otra terapia anti-inflamatoria con anticuerpos monoclonales, y similares, en donde el tratamiento con la terapia adicional o con las terapias adicionales, se presenta antes, durante, o después del tratamiento del sujeto con el medicamento, el cual comprende los anticuerpos antagonistas o las proteínas anti-CD40 de la divulgación, como se observa anteriormente en la presente.

En una realización, la presente divulgación proporciona el anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3 para utilizarse en el tratamiento de una enfermedad autoinmune y/o de una enfermedad inflamatoria en un sujeto, en donde el medicamento se coordina con el tratamiento con al menos otra terapia, como se observa anteriormente en la presente.

10 En algunas realizaciones, el medicamento que comprende el anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal mAb1, mAb2 o mAb3, que se da a conocer en la presente, o un fragmento de enlace de antígeno del mismo, se coordina con el tratamiento con otras dos terapias.

15 Cuando el medicamento que comprende el anticuerpo antagonista anti-CD40 se coordina con otras dos terapias, el uso del medicamento puede ser antes, durante, o después del tratamiento del sujeto con cualquiera o ambas de las otras terapias.

La divulgación también proporciona un anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo mAb1, mAb2 o mAb3 que se da a conocer en la presente, para utilizarse en el tratamiento de una enfermedad autoinmune y/o de una enfermedad inflamatoria en un sujeto, en donde el medicamento se utiliza en un sujeto que se ha tratado previamente con al menos otra terapia.

20 "Previamente tratado" o "tratamiento previo" significa que el sujeto ha sido tratado con una o más terapias distintas antes de recibir el medicamento que comprende el anticuerpo antagonista o la proteína anti-CD40 de la divulgación.

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

Leyendas de las figuras

25 La Figura 1 muestra la incorporación de ³H-timidina después de 72 horas de cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas estimuladas con una respuesta a la dosis de Chir12.12 (círculo hueco), mAb1 (círculo negro), mAb2 (cuadro negro), mAb3 (triángulo negro) o el CD40L humano (cuadro hueco).

30 La Figura 2 muestra la incorporación de ³H-timidina después de 72 horas de cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas estimuladas con una respuesta a la dosis de Chir12.12 (círculo hueco), mAb1 (círculo negro), mAb2 (cuadro negro), mAb3 (triángulo negro), el CD40L humano (cuadro hueco), control de isotipo (rombo negro) co-estimulados en la presencia de ya sea 5 microgramos/mililitro de F(ab')₂ anti-IgM o CpG2006 1 μM.

35 La Figura 3 muestra la incorporación de ³H-timidina después de 72 horas de cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas estimuladas con una respuesta a la dosis de Chir12.12 (círculo hueco), mAb1 (círculo negro), mAb2 (cuadro negro), mAb3 (triángulo negro), el CD40L humano (cuadro hueco), control de isotipo (rombo negro) co-estimulados en la presencia de 75 nanogramos/mililitro de IL-4.

La Figura 4 muestra la incorporación de ³H-timidina después de 72 horas de cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas estimuladas con 20 microgramos/mililitro de CD40L con una respuesta a la dosis de Chir12.12 (círculo hueco), mAb1 (círculo negro), mAb2 (cuadro negro), mAb3 (triángulo negro) o el CD40L humano (cuadro hueco).

40 La Figura 5 muestra el enlace dependiente de la dosis del anticuerpo anti-CD40 humano para las líneas celulares BJAB, respectivamente, Chir12.12 (círculo negro), mAb1 (cuadro hueco), mAb2 (triángulo hueco), mAb3 (triángulo negro).

EJEMPLOS

Materiales

45 1. Anticuerpos monoclonales

Se proporcionaron Chir12.12 (1.9 miligramos/mililitro), mAb1 (0.88 miligramos/mililitro), mAb2 (1.9 miligramos/mililitro), y mAb3 (1.9 miligramos/mililitro) en Citrato 50 mM, pH de 7.0, NaCl 140 mM. También se utilizó un control de isotipo de IgG para los experimentos de selección (Sigma, St. Louis, EUA).

2. Estímulos de activación de células B

50 El fragmento F(ab')₂ AfiniPure de IgM de conejo anti-humano se obtuvo en Jackson Immuno Research (Suffolk, Reino Unido), y el CpG2006 se obtuvo en Microsynth (Balgach, Suiza). El CD40L humano recombinante se generó

empleando los procedimientos convencionales conocidos por aquéllos de una experiencia ordinaria en este campo. El sobrenadante que contenía la IL-4 humana se generó empleando los procedimientos convencionales conocidos por aquéllos de una experiencia ordinaria en este campo.

3. Reactivos de cultivo de tejido *in vitro*

- 5 Medio de cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC): RPMI-1640, suero bovino fetal (FBS) al 10 %, Penicilina/Estreptomina al 1 %, aminoácidos no esenciales al 1 %, piruvato de sodio al 1 %, β-mercaptoetanol 5 mM (todos de Invitrogen, San Diego, EUA).

Métodos

1. Ensayo de proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) mediada por CD40L

10 1.1 Purificación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humanas

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se purificaron a partir de recubrimientos esponjosos de sangre entera obtenidos a partir de voluntarios sanos (Blutspendezentrum, Basilea). Los recubrimientos esponjosos se diluyeron a 1:4 con suero regulado con fosfato (PBS) sin Ca²⁺ y Mg²⁺ que contenía EDTA 5 mM, y se hicieron alícuotas de 25 mililitros en tubos Falcon de 50 mililitros. Los recubrimientos esponjosos diluidos se respaldaron con 15 mililitros de Ficoll-Plaque más (GE Healthcare) por tubo Falcon, y se centrifugaron a temperatura ambiente durante 20 minutos a 2,250 revoluciones por minuto (sin frenar). En seguida de la centrifugación, la capa de interfase se transfirió a un solo tubo Falcon de 50 mililitros. Las capas de interfase a partir de múltiples tubos (a partir de un solo donador) se combinaron hasta un volumen de 30 mililitros. Se agregó suero regulado con fosfato (PBS) complementado con EDTA 5 mM, y las células se centrifugaron a temperatura ambiente durante 5 minutos a 2,250 revoluciones por minuto. El sobrenadante se desechó antes de la adición de 15 mililitros de regulador de lisis de glóbulos rojos sanguíneos (RBC), y de la incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos. Subsiguientemente, se agregaron 20 mililitros de suero regulado con fosfato (PBS)/EDTA 5 mM, y las células se centrifugaron nuevamente (a temperatura ambiente/5 minutos, a 2,250 revoluciones por minuto). Las células se lavaron dos veces en suero regulado con fosfato(PBS)/EDTA 5 mM (con interviniendo pasos de centrifugación), y se volvieron a suspender en 35 mililitros del medio de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) antes de la determinación del número de células viables utilizando exclusión con tinte Trypan Blue. Las células que no se usaron inmediatamente para la estimulación *in vitro* se crioconservaron.

1.2 Ensayo de estimulación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) *in vitro*

Se hicieron series de dilución dobles de siete puntos de cada mAb anti-CD40 o de control de isotipo por triplicado en placas Costar de 96 pozos en la presencia o en ausencia de una dosis constante de 5 microgramos/mililitro de F(ab')₂ anti-IgM, CpG2006 1 μM, el sobrenadante que contenía la IL-4 humana (75 nanogramos/mililitro), o 40 microgramos/mililitro de huCD40L recombinante (las concentraciones finales indicadas). Las concentraciones iniciales de cada mAb anti-CD40 estuvieron en el intervalo de 20 microgramos/ mililitro a 100 microgramos/mililitro, dependiendo del experimento. Se utilizó el CD40L en la respuesta a la dosis como un control positivo para todos los experimentos. Las dosis de anti-IgM, CpG2006, IL-4 y CD40L se seleccionaron basándose en los experimentos anteriores, en donde se evaluó la capacidad de estos reactivos (solos o en combinación) para inducir las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) o la proliferación de células B, en la respuesta a la dosis (no se muestran los datos). Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) (densidad final de 8x10⁴ por pozo) se agregaron subsiguientemente a cada pozo antes de la incubación durante 3 días a 37 °C/CO₂ al 5 %. Se agregó ³H-timidina (1 μCi/50 microlitros/pozo) a cada pozo durante las 6 horas de cultivo finales antes de la cosecha, y la determinación de la incorporación de timidina utilizando un contador de centelleo MicroBetaTrilux. Observe que se incluyeron las células más el medio, y las células más el medio más los cultivos de control anti-IgM, IL-4, CpG2006 o CD40L (en ausencia de los mAbs anti-CD40) en cada experimento.

Los datos de centelleo se analizaron utilizando Excel y el software GraphPad Prism. Los resultados se presentan como los recuentos promedio por minuto (cpm) (+/- error estándar del promedio) contra una transformación log de la concentración del mAb anti-CD40. En cada gráfica se indican los niveles del fondo de los controles positivos y de las células más el medio. Los valores IC₅₀ o EC₅₀ se calcularon sujetos a un ajuste de la curva de éxito de los datos mediante Prism.

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se estimularon como se indica anteriormente, con 20 microgramos/ mililitro de CD40L en la presencia o en ausencia de una respuesta a la dosis del mAb anti-CD40 de prueba durante 3 días. La proliferación se evaluó por la incorporación de ³H-timidina después de 72 horas de cultivo. Los resultados se presentan como el promedio de los cultivos triplicados con el SEM, y son representativos de 4 donadores (experimentos independientes). Los valores IC₅₀ para la inhibición mediada por el mAb anti-CD40 se tabulan en microgramos/mililitro.

55 2. Ensayo de agonista de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) *in vitro*

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humanas se estimularon como se indica en el párrafo 1.2

anterior, con una respuesta a la dosis de Chir12.12, mAb1, mAb2 o mAb3 durante 3 días, ya sea en ausencia de co-estimulación o bien en la presencia de cualquiera de 5 microgramos/mililitro de F(ab')₂ anti-IgM o CpG2006 1 μM. La proliferación se evaluó por la incorporación de ³H-timidina después de 72 horas de cultivo. Los resultados se presentan como el promedio de los cultivos triplicados con el SEM y son representativos de 4 donadores (experimentos independientes).

3. Ensayo de ADCC

Se agregaron 50 microlitros de una suspensión de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) (10 x 10⁶ células/mililitro) a los pozos de fondo redondo (Corning Incorporated - Costar #3790), y se agregaron 50 microlitros de células Raji teñidas con calceína a (2 x 10⁵ células/mililitro), y 100 microlitros de dilución de anticuerpo o los controles. La máxima lisis se determinó en Triton 100 al 2 %.

Las células se recolectaron en el fondo de la placa (3 minutos a 250 g), y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ (al 5 %) humidificada durante 1 hora. Las células se separaron del medio mediante centrifugación (3 minutos a 750 g), y se transfirieron 100 microlitros del sobrenadante a una placa negra de fondo transparente (Corning Incorporated - Costar #3904) para la medición.

La fluorescencia se determinó a 535 nanómetros después de la excitación a 485 nanómetros con un espectrómetro SpectraMax Gemini (Molecular Devices). La lisis específica se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$(\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea}) / (\text{máxima liberación} - \text{liberación espontánea}) \times 100.$$

4. Enlace de variantes de anticuerpos anti-CD40 humanos para la línea celular BJAB humana

Se utilizó citometría de flujo, con el objeto de comparar el enlace de las diferentes variantes de Fc de anticuerpos anti-CD40 con su enlace a las células BJAB humanas. Por consiguiente, se sembraron 2 x 10⁵ células por pozo en una placa de fondo en V de 96 pozos. Las placas se lavaron dos veces con 200 microlitros de regulador FACS (suero regulado con fosfato (PBS), suero fetal de becerro (FCS) al 5 %, EDTA 2 mM) durante 2 minutos a 4 °C a 1,350 x g. Los sobrenadantes se desecharon, y las células se volvieron a suspender en 100 mililitros de regulador FACS que contenía suero humano al 8 % (Invitromex, Cat. No. S4190), y se incubaron durante 10 minutos. Después de dos lavados, se agregaron las variantes de Fc anti-CD40 humano en 50 microlitros de regulador FACS con suero humano al 1 %, empezando con una concentración de 10 microgramos/mililitro en una dilución a 1:2. Las células se incubaron durante 30 minutos sobre hielo, seguido por dos pasos de lavado. A cada pozo se le agregaron 50 microlitros de FITC de conejo policlonal anti-IgG humana, F(ab')₂ (DAKO, Cat. No. F 0315), y se incubaron durante 30 minutos sobre hielo. Al final de la incubación, las células se lavaron dos veces, se volvieron a suspender en 100 microlitros de regulador FACS, y se adquirieron en un FACS Cantoll.

Después de la adquisición, se adquirió la intensidad de fluorescencia promedio del canal de FITC en FloJo. La graficación y el ajuste de la curva se llevaron a cabo con GraphPad Prism 5.0. Debido a las intensidades cambiantes entre los experimentos individuales, se normalizaron los valores. Por consiguiente, el valor más alto de cada serie de prueba de anticuerpo se igualó al 100 %. Los ajustes de curva no lineales se llevaron a cabo con los valores de porcentaje.

5. Ensayo de producción de citoquina mediada por CD40L en células dendríticas derivadas de monocitos (MoDCs)

5.1 Preparación de células dendríticas derivadas de monocitos humanos

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humanas se prepararon a partir de los recubrimientos esponjosos humanos proporcionados por la Cruz Roja Suiza. El recubrimiento esponjoso se diluyó a 1:5 en suero regulado con fosfato (PBS) (Invitrogen, Cat. No. 20012019), y se distribuyó en alícuotas de 35 mililitros en tubos Falcon de 50 mililitros. Subsiguientemente, se aplicaron 13 mililitros de Ficoll (GE Healthcare, Cat. No. 17 1440-02) a cada tubo. Las células se centrifugaron a 1,680 x g a temperatura ambiente durante 20 minutos sin romperse. La capa que contenía las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se recolectó y se lavó dos veces en un volumen grande de suero regulado con fosfato (PBS) durante 5 minutos a 1,000 x g. Finalmente, las células se volvieron a suspender en 10 mililitros de suero regulado con fosfato (PBS) y se contaron.

Los monocitos humanos se aislaron negativamente a partir de 100 x 10⁷ células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) utilizando el kit II de aislamiento de monocitos humanos de Miltenyi (Miltenyi, Alemania, Cat. No. 130-091-153) en un instrumento AutoMACS de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después del aislamiento, células se lavaron dos veces durante 5 minutos a 1,000 x g a 4 °C en el medio de cultivo (RPMI1640 (Invitrogen, Cat. No. 61870010), suero fetal de becerro (FCS) al 10 % (Invitrogen, Cat. No.16000044, origen de los Estados Unidos), piruvato de sodio 1 mM (Invitrogen, Cat. No. 11360039), 1 x NEAA (Invitrogen, Cat. No. 11140035) 1 x Penicilina/Estreptomicina (Invitrogen, Cat. No. 15140122)). Los monocitos aislados se contaron, se aplicaron en placas de 6 pozos a una densidad de 0.4 x 10⁶/mililitro, y se cultivaron durante siete días a 37 °C, con CO₂ al 5 %. Para diferenciar los monocitos para las células dendríticas, se agregaron, IL-4 humana [80 nanogramos/mililitro] y GM-CSF humano [100 nanogramos/mililitro] recombinantes (ambos producidos internamente en la empresa) al medio de cultivo al inicio del cultivo.

5.2 Estimulación de células dendríticas (DCs) para la liberación de citoquina

Las células dendríticas (DCs) inmaduras se cosecharon después de 7 días de cultivo enjuagando las placas de 6 pozos, reservando las células, y lavándolas dos veces durante 5 minutos a 1,400 x g en el medio de cultivo. Subsecuentemente, se sembraron 2 x 10⁵ células dendríticas inmaduras (iDCs) en placas de fondo plano de 96 pozos (Becton Dickinson, Cat. No. 353072) a 100 microlitros. Para el control positivo, las células se estimularon con MegaCD40L (Alexis, Cat. No. ALX-522-110-C010) en una concentración de 1 microgramo/mililitro, el control negativo consistió en las células dendríticas inmaduras (iDCs) en el medio solamente. En el ensayo de antagonismo, se agregaron las variantes Fc del anticuerpo anti-CD40 humano a 10 microgramos/mililitro en una dilución a 1:2, junto con 1 microgramo/mililitro de MegaCD40L para una respuesta a la dosis. Los sobrenadantes de las células estimuladas se recolectaron 24 horas después para la medición del TNF α . En el ensayo de agonismo, se agregaron las variantes Fc del anticuerpo anti-CD40 humano a 10 microgramos/mililitro en una dilución a 1:2 solamente, y los sobrenadantes se recolectaron después de 48 horas para la medición del TNF α . Las células se sembraron y se estimularon por triplicado para todos los ensayos.

5.3 Medición del TNF-alfa mediante ELISA

Con el fin de medir la cantidad de TNF α en los sobrenadantes, se llevó a cabo el ELISA como sigue. Se recubrió el anticuerpo de captura anti-TNF α (BD Pharmingen, Cat. No. 551220) en las placas ELISA (Greiner, Nunc F96 Maxisorp, Cat. No. 442404) a 5 microgramos/mililitro, en 50 microlitros por pozo, durante la noche a 4 °C. Por cada paso de lavado, las placas se lavaron 3 veces con 250 microlitros en una lavadora de placas BioTek ELx 405. Después del primer lavado, se incubaron 200 microlitros de Superblock TBS (Thermo Scientific, Pierce, Cat. No. 37535) durante 1 hora a 37 °C. En seguida, se agregó el estándar de TNF α (TNF α humano recombinante, R&D Systems, Cat. No. 210-TA) o la muestra, en 25 microlitros. El estándar empezó en una concentración final de 20 nanogramos/mililitro en una serie de dilución a 1:2. En adición, se agregaron 25 microlitros del anticuerpo de detección (TNF α -biotina anti-humano, BD Pharmingen, Cat. No. 554511), en una dilución a 1:500. Las placas se incubaron durante la noche a 4 °C. Después de lavar, se agregó el conjugado de Avidina-POD (fosfatasa alcalina ExtrAV, Sigma, Cat. No. E-2636) diluido a 1:5000 en Superblock TBS, en 50 microlitros, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron, y se agregaron 50 microlitros del sustrato de fosfato de p-nitro-fenilo (Sigma, Cat. No. C-3041), para revelar durante 15 minutos. Las placas ELISA se leyeron a 450 nanómetros con el software SoftMax Pro en un SpectraMax M5 (Molecular Devices).

6. Estudio de toxicología

El propósito inicial primario del estudio de toxicología fue investigar la toxicidad potencial del mAb1 en una dosis alta (100 mg/kg) en comparación con el Chir12.12.

Se utilizaron treinta monos cinomolgos de origen de Mauritania para este estudio. Al inicio de la dosificación, los animales eran de aproximadamente 4 a 5 años de edad, y pesaban de 4.5 a 6.6 kilogramos los machos, y de 3.1 a 4.3 kilogramos las hembras.

El mAb1 (50 miligramos/mililitro) se administró intravenosamente a un grupo de monos cinomolgos (5 machos/5 hembras; grupo 2) en un nivel de dosis de 100 mg/kg y en un volumen de dosis de 2 mililitros/kilogramo una vez por semana durante 5 semanas (aplicaciones del artículo de prueba en los días 1, 8, 15, 22, 29, y 36). Un grupo adicional de monos cinomolgos (5 machos/5 hembras; grupo 3) recibió el anticuerpo progenitor Chir12.12 intravenosamente mediante infusión lenta de bolo en un nivel de dosis de 100 mg/kg y en un volumen de dosis de 5 mililitros/kilogramo. Se dio el placebo del mAb1 en un volumen de dosis de 2 mililitros/kilogramo a otro grupo de monos cinomolgos, los cuales sirvieron como controles (5 machos/5 hembras; grupo 1). Todos los animales se sometieron a necropsia uno o dos días después de la última dosificación.

Se decidió incorporar una inmunización con hemocianina de lapa californiana (KLH) con el objeto de evaluar la eficacia de ambos Abs anti-CD40. En el día 2, los animales se inmunizaron con 1 miligramo de KLH in Alum seguida por una inyección de refuerzo de 0.5 miligramos de hemocianina de lapa californiana (KLH) en Alum en el día 23. El suero se muestreó antes de la inmunización/refuerzo, así como en los días 7 y 14 después de la inmunización y del refuerzo, respectivamente. Se determinaron las titulaciones de IgM/IgG específicas de la hemocianina de lapa californiana (KLH) con el ELISA utilizando el suero de referencia de IgM/IgG anti-KLH de mono cinomolgo como estándar. La sangre se muestreó en 3 ocasiones antes de la dosis y en el día 15, 29 y en la necropsia (día 37/38) para la inmunofenotipificación de las células B puras (CD20+CD21+CD27-). Los recuentos absolutos de las células B CD20 puras se calcularon a partir del recuento total de linfocitos por muestra de sangre, y el recuento relativo de células B CD20 puras mediante citometría de flujo.

Tabla 4

Compendio del Estudio de Toxicología

# de Grupo	Descripción del Grupo	Nivel de dosis (mg/kg/dosis)	Volumen de Dosis* (ml/kg)	Animales/grupo		Necropsia después de 5 semanas
				Macho	Hembra	
1	Control	0	2	5	5	5 M/5 F
2	mAb1	100	2	5	5	5 M/5 F
3	Chir12.12	100	5	5	5	5 M/5 F

* Basándose en el peso corporal individual más reciente.

5 La evaluación de la toxicidad se basó en la mortalidad, en las observaciones clínicas (signos clínicos, incluyendo las observaciones después de la dosificación, la evaluación de las heces, la inspección de la piel, y el consumo de alimento), los pesos corporales, los exámenes oftálmicos, las investigaciones cardiovasculares la patología clínica (incluyendo coagulación, exámenes externos de activación de plaquetas, hematología, química clínica, y análisis de orina), los pesos de los órganos, y los descubrimientos macroscópicos y microscópicos de la necropsia. La inmunofenotipificación de la sangre se llevó a cabo tres veces antes de la dosis, en los días 15 y 29 de la fase de dosificación, así como en el día de la necropsia. Adicionalmente, se llevó a cabo la inmunofenotipificación del tejido del bazo y el drenado de los ganglios linfáticos del sitio de inyección de la hemocianina de lapa californiana (KLH) en la necropsia. En adición, se examinó la respuesta del anticuerpo dependiente de las células T (TDAR) a la hemocianina de lapa californiana (KLH), para comparar directamente la influencia del Chir12.12 completamente capaz de tener ADCC con el mAb1. Se recolectó la sangre de todos los animales para la evaluación toxicocinética, y para una posible evaluación del anticuerpo anti-fármaco (ADA).

7. Perfilación adicional *in vitro* del mAb1

7.1 Purificación de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humanas se prepararon como se describe anteriormente en la sección 1.1.

20 7.2 Purificación de células B de amígdalas humanas

Se removió la cápsula de la amígdala y el tejido conectivo, y después se cortó el material de la amígdala en pedazos grandes de aproximadamente 5 milímetros antes de machacarse a través de un cernidor de células metálico, lavando regularmente con el medio de células B. Las células de las amígdalas se filtraron entonces dos veces a través de un cernidor de células de 70 micras, con el objeto de remover el desecho celular. Las células B se aislaron de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) frescas utilizando un Kit de Enriquecimiento de Células B Humanas de Selección Negativa EasySep (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canadá). Las células B se purificaron utilizando un Kit de Enriquecimiento de Células B Humanas de Selección Negativa EasySep de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canadá).

30 7.3 Evaluación de los valores EC50 del enlace de CD40 utilizando células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humanas y de primate no humano o células B

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) (de mono rhesus, de mono cinomolgo, o humanas) o las células B de las amígdalas (humanas solamente) se incubaron a 4 °C durante 30 minutos con el mAb1 marcado purificado o con los anticuerpos de control de isotipo en la respuesta a la dosis (intervalo de concentración final de 2.5 microgramos/mililitro – 0.00125 microgramos/mililitro). Las células subsiguientemente se lavaron antes de incubarse con un anticuerpo de IgG anti-humano (que reacciona cruzadamente con primate no humano), y anti-humano biotinilado con una reactividad cruzada mínima con las NHPs (R10; observe que fue posible distinguir las células B humanas que expresaban la IgG de membrana, ya sea incluyendo una cepa anti-IgM, o bien por medio de la intensidad diferencial del teñido con FACS). Las células nuevamente se incubaron a 4 °C durante 30 minutos antes de lavarse, y se sometieron a un teñido final con estreptavidina-FITC durante 20 minutos a 4 °C. Las células subsiguientemente se lavaron, y se llevó a cabo la evaluación de la expresión de CD40 en las células CD20+

mediante citometría de flujo.

7.4 Evaluación de la inhibición de la proliferación inducida por CD154 de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humanas y de primate no humano o de las células B

5 Se hicieron series de dilución dobles de siete puntos de cada mAb anti-CD40 o de control de isotipo por triplicado en placas de 96 pozos en la presencia de concentraciones EC80 de CD154 e IL-4 humanas recombinantes. Las concentraciones iniciales de cada mAb anti-CD40 estuvieron en el intervalo de 20 microgramos/mililitro a 100 microgramos/mililitro, dependiendo del experimento. Las células y los controles del medio se utilizaron como controles negativos para todos los experimentos. Subsiguientemente se agregaron a cada pozo las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) (de mono rhesus, de mono cinomolgo, o humanas) o las células B de 10 las amígdalas (humanas solamente) antes de la incubación durante 3 días a 37 °C/CO₂ al 5 %. A cada pozo se le agregó ³H-timidina (1 µCi/50 microlitros/ pozo), durante las 6 horas finales del cultivo antes de de la cosecha y de la determinación de la incorporación de timidina utilizando un contador de centelleo.

8. Eficacia del mAb1 combinado con ciclosporina A en un modelo de alo-trasplante de riñón en mono cinomolgo

8.1 Animales

15 Todos los monos cinomolgos (*Macaca fascicularis*) utilizados fueron machos de 7.5-9 años de edad (#5529/#5533, #5523/#5524 y #5536/#5538), criados en cautividad, de 7.7 ± 0.9 kilogramos, y originarios de las Filipinas (Siconbrec, Makati City, Filipinas). En el momento del trasplante, los animales presentaron análisis normales de hematología y de química de suero/orina, y fueron negativos para tuberculosis, Salmonela/Shigella, para anticuerpos 20 contra agentes virales (HerpesB, virus de leucemia de células T de simio, virus de inmunodeficiencia de simio, retrovirus tipo D de simio, Hepatitis B), y para los ecto/endoparásitos relevantes. Sin embargo, todos los animales presentaron anticuerpos contra Citomegalovirus y Virus de Hepatitis A (HAV) (probados en el 2010; el animal #5536 fue negativo para HAV). La coprología del animal #5523 probó ser positiva para *Balantidium coli* en Diciembre de 2010.

25 Durante la primera semana después de la cirugía, los animales se alojaron en jaulas individuales de telemetría, permitiendo el contacto visual entre ellos. El resto del tiempo, los animales #5536/#5538 se alojaron juntos, y los 4 animales restantes se mantuvieron aislados durante todo el experimento (animales incompatibles). Todos los animales se alojaron bajo una temperatura sostenida (20-24 °C), con al menos el 40 % de humedad, y con un ciclo de luz natural. Todos se alimentaron al menos dos veces al día con mezcla de frutas y verduras. Se proporcionaron agua y gránulos Kliba Nafag 3446 (Kaiseraugst, Alemania) al gusto.

30 Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con los Reglamentos Suizos de Bienestar Animal y bajo la licencia BS1555.

Tabla 5

Características del animal

Especie	Raza	Categoría	Vendedor	Género	Peso	Edad
Cinomolgo (<i>Macaca fascicularis</i>)	Cualquier raza	Sin especificar	BioPRIM	M/F	7.7±0.9	7.5-9

35 8.2 Condiciones experimentales

8.2.1 Trasplante de riñón, y monitorización post-operatoria

Los pares de donador/receptor se seleccionaron de acuerdo con el emparejamiento ABO, mal emparejamiento exón2 DRB (Blancher A, Tisseyre P, Dutaur M y colaboradores (2006) Immunogenetics; 58(4): 269-82), y las respuestas en la reacción de linfocitos mixtos de una vía (MLR), con índices de estimulación de MLR (MLR-SIs) >7 y <47 (Bigaud M, Maurer C, Vedrina y colaboradores (2004) J. Pharmacol. Toxicol. Methods; 50(2): 153-9). Los resultados de esta selección se muestran en la Tabla 6, y consistieron en duo-trasplante (trasplante intercambiado entre 2 donadores). A cada receptor se le implantó una sonda telemétrica (Data Sciences Inc, EUA) para monitorizar la presión sanguínea arterial, la frecuencia cardíaca, y la actividad motora.

45 Para la cirugía, se indujo anestesia general mediante quetamina; 10 mg/kg, intramuscularmente (i.m.), asociada con atropina (0.05 mg/kg intramuscularmente (i.m.)), y se mantuvo mediante ventilación con N₂O/O₂ (50:50), y propofol intravenosamente (i.v.) (de 4 a 10 mg/kg/hora; complementado por 5 a 10 miligramos de bolo siempre que se requiriera). Los riñones de los donadores se cosecharon, se inundaron con solución de la Universidad de Wisconsin

fría (4 °C) (tiempo de conservación fría \leq 4 horas), y se trasplantaron heterotópicamente, empleando técnicas microvasculares convencionales para crear una anastomosis de extremo a costado entre la vena renal de injerto y la vena cava del receptor, y entre la arteria renal de injerto y la aorta distal del receptor (tiempo de anastomosis \leq 40 minutos). Se llevó a cabo una uretero-cistoneostomía después de la aparición de orina a partir del injerto. Los riñones nativos se removieron. Se proporcionó analgesia post-operatoria mediante buprenorfina, de 0.01 a 0.02 mg/kg, intramuscularmente (i.m.), tres veces al día; antibióticos (cefotaxima, 25 mg/kg, intramuscularmente (i.m.), dos veces al día; o ceftriaxón, 50 mg/kg, intramuscularmente (i.m.) en lidocaína al 1 %, cuatro veces al día). La analgesia y los antibióticos se proporcionaron durante 5 días. Siempre que los recuentos de plaquetas experimentaban un aumento notorio o disminuían, se administraba aspirina en una dosis de 5 mg/kg intramuscularmente (i.m.) al día (Aspegic, Sanofi-Aventis, Meyrin, Suiza).

Los receptores se monitorizaron para detectar los cambios en las condiciones clínicas y cardiovasculares, el peso corporal, la ingestión de alimento y agua (complementado con max. de 100 a 150 mililitros/kilogramo/día), la producción de orina, la hematología (usando el Beckmann Coulter ACT5Diff), la química en suero y orina (usando un analizador Vetscan para la determinación diaria de SCrea/SUrea/SAmilasa y un analizador Beckmann Synchron CX5 para la confirmación final de las muestras de suero y orina). Se utilizaron los niveles en suero de creatinina (SCrea) y urea (SUrea) como marcadores de la función del injerto. Se llevaron a cabo biopsias transcutáneas guiadas por ultrasonido, con una aguja calibre 16g, como se describe anteriormente (Gaschen L, Kunkler A, Menninger K y colaboradores (2001) Vet. Radiol. Ultrasound; 42(3): 259-64), bajo anestesia general en el día 30 (animales #5529 y #5533, solamente). En adición, también se llevó a cabo una monitorización especial para la coagulabilidad de la sangre y la acumulación de plaquetas en los animales #5529/#5533 y #5523/#5524 antes y después del trasplante.

Los receptores finalmente se eutanzaron en el caso de: (i) falla grave del injerto (por ejemplo, SCrea $>$ 500 micromoles/litro o SUrea $>$ 20 milimoles/litro) asociada o no con un aumento en el puntaje del ultrasonido; o (ii) problemas de salud general y/o signos clínicos evidentes de malestar. En la necropsia, se recolectaron los aloinjertos de riñón (incluyendo uréter y anastomosis), junto con todos los otros órganos mayores, y se procesaron para el siguiente análisis histológico.

Tabla 6

Información general acerca de las combinaciones de donador/receptor y regímenes de tratamiento empleados

Receptor	Peso corporal (kg)	Donador	ABO	MLR-SI (una vía)	mAb1/CsA (ml/kg, i.v./p.o.)	Fecha del trasplante
5529 ♂	7.35	5533 ♂	B/B	16	30/20	21.09.10
5533 ♂	6.1	5529 ♂	B/B	9	30/20	21.09.10
5523 ♂	8.2	5524 ♂	B/B	7	30/20	18.01.11
5524 ♂	8.3	5523 ♂	B/B	18	30/20	18.01.11
5536 ♂	8	5538 ♂	B/B	47	30/20	07.06.11
5538 ♂	8.45	5536 ♂	B/B	11	30/20	07.06.11

30 8.2.2 Tratamientos con mAb1 y ciclosporina A (CsA)

El mAb1 se proporcionó en una forma líquida recién descongelada en el día de la infusión desde -80 °C. Se hizo la aplicación de 30 mg/kg/intravenosamente (i.v.) una vez por semana, exceptuando las primeras tres dosis en el día -1, 0 y 1 (antes y después del trasplante). La CsA para administración oral (p.o.) fue una solución para beber de un pre-concentrado en microemulsión (Sandimmun Neoral (RTM), 100 miligramos/mililitro, Novartis Pharma AG). La CsA se aplicó en una dosis diaria (empezando en el día -1) de 20 mg/kg/oralmente (p.o.), en combinación con el mAb1 (véase la Tabla 6).

8.2.3 Monitorización de la farmacocinética (PK), la inmunogenicidad (anticuerpo de primate anti-humano), y la

farmacodinamia (PD) del mAb1

Se recolectaron muestras de sangre (500 microlitros de suero) (antes de la dosificación intravenosa (i.v.)) para la determinación de las exposiciones al mAb1 en el día -1, 3, 7 (línea basal y 15 minutos), 14, 28, 42, 56, 70, 84 y 100. Para las determinaciones de la CsA, se recolectaron muestras de sangre antes de la dosificación oral de la CsA (C0/C24), y 2 horas después de la aplicación (C2). C2 corresponde a los niveles pico de absorción de CsA. Todo el material se almacenó a -80 °C hasta su procesamiento adicional (kit de detección de CsA, Hot Star Taq Master Mix, Qiagen Minnesota, US). Las muestras para la inmunogenicidad del mAb1 se recolectaron (50 microlitros de suero) en los días -1, 7, 14, 28, 42, 56, 70, 84 y 100 y se mantuvieron congeladas a -80 °C. Dicho de una manera breve, las placas de microtitulación de 96 pozos se recubrieron con el CD40 humano recombinante. Éstas se almacenaron a una temperatura nominal de 4 °C durante la noche. En seguida del bloqueo, se agregaron a la placa estándares calibradores (Cs), muestras de control de calidad (QC), y especímenes de muestra que contenían el mAb1. La placa se incubó a una temperatura nominal de +25 °C durante 120 minutos con agitación. En seguida del lavado de la placa, se agregó a la placa el anticuerpo de cadena ligera kappa de ratón anti-humano, seguido por el conjugado de cabra anti-ratón/HRP (H+L), para detectar cualquier mAb1 enlazado al CD40 recombinante. Éste se visualizó mediante la adición de un sustrato cromogénico (TMB), y la intensidad del color producido (absorbencia) fue directamente proporcional a la concentración del mAb1 presente. La concentración del mAb1 en las muestras se retro-calculó entonces a partir de una curva de calibración. Las muestras farmacodinámicas (PD) se obtuvieron de 2 a 3 días antes del trasplante como las líneas basales (0.5 mililitros en heparina). Después de la recolección, se siguió el mismo programa que para las muestras farmacocinéticas (PK). Las células CD20+ y CD3+ se contaron con Tubos TruCount (Becton Dickinson, cat# 340334) utilizados de acuerdo con las instrucciones del fabricante con un mAb APC anti-CD40 humano (Clon 5C3, Becton Dickinson, cat# 555591), un PerCP anti-CD3 humano (Clon SP34-2, Becton Dickinson, cat# 552851), y un mAb FITC anti-CD20 humano (Clon LT20, Immunotools, cat# 21279203X2). Los datos se adquirieron en un citómetro de flujo LSRII (Becton Dickinson Biosciences) utilizando el software DIVA (versión 6.1.1). Los linfocitos y las perlas se pasaron a la gráfica de puntos de FSC/SSC de acuerdo con los tamaños y la granularidad, y se analizaron adicionalmente para la expresión de CD20 y CD3.

8.2.4 Histología

Todos los tejidos recolectados (biopsias de injerto o en la necropsia) se examinaron macroscópicamente y se fijaron en formalina regulada al 4 %. Después de la deshidratación, se embebieron en cera de parafina.

Se cortaron secciones de 3 micras de espesor a partir de los bloques de parafina, y se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE). Se llevaron a cabo tres teñidos adicionales (ácido peryódico de Schiff, tricromo, y Verhoeff) en las secciones de riñón. Las muestras de la biopsia y de la necropsia fueron examinadas por un patólogo experimentado, y se calificaron de acuerdo con la clasificación de patología de aloinjerto renal 07 de Banff (Solez K, Colvin RB, Racusen LC y colaboradores (2008) *Am. J. Transplant*; 8(4): 753-60). Los expertos externos también llevaron a cabo la revisión del compañero.

En adición, se llevó a cabo la inmunohistoquímica para la proteína de complemento C4d utilizando un anticuerpo polivalente anti-C4d adecuado para teñir las secciones de parafina (Regele H, Exner M, Watschinger B y colaboradores, 2001, *Nephrol. Dial. Transplant*; 16: 2058-2066). C4b se considera como un marcador estable y confiable del rechazo humoral agudo (AHR). Después de la fijación y la incrustación en cera de parafina, se prepararon portaobjetos (SuperFrostPlus, RTM, Menzel-Glaeser, Alemania) con las secciones de 3 micras de espesor, y se secaron durante la noche en un horno a 37 °C para la adhesión óptima a los portaobjetos. Se agregaron las secciones de riñón humano rechazadas como un control positivo. Antes de usarse, los portaobjetos se desparafinizaron en Xileno (10 minutos), se rehidrataron a través de etanol graduado, y se colocaron en agua destilada. La recuperación del antígeno se llevó a cabo cocimiento a presión durante 10 minutos a 1 bar el regulador de citrato (pH de 6.0), como se describió anteriormente (Segeer S, Mack M, Regele H, Kerjaschki D, Schlöndorff D. *Kidney Int.* 1999; 56: 52–64). Para el inmunoteñido, se empleó el siguiente procedimiento: (i) se inactiva la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 0.5 % en metanol absoluto durante 20 minutos a temperatura ambiente; (ii) se lavan los portaobjetos en suero regulado con fosfato (PBS) 0.01 M, pH de 7.4 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Alemania); (iii) se incuban los portaobjetos con leche descremada en polvo al 4 % "Rapilait" en suero regulado con fosfato (PBS) (Migros Genossenschaftsbund, Suiza) durante 60 minutos a temperatura ambiente; se destara, no se lava; (iv) se incuban los portaobjetos con el pAb C4d de conejo anti-humano (Biomedica Medizinprodukte, Viena, Austria), 1:40, en suero regulado con fosfato (PBS) que contiene NGtS al 1 % durante la noche a +4 °C. El segundo portaobjetos sirve como un control negativo mediante la aplicación de control de isotipo de conejo (Zymed Laboratories Inc, EUA) en lugar del anticuerpo primario; (v) se lavan los portaobjetos en suero regulado con fosfato (PBS) 0.01 M, pH de 7.4; (vi) se incuban todos los portaobjetos con IgG biotinilada de cabra anti-conejo (Vector Laboratories, Inc. EUA), 1:200, en suero regulado con fosfato (PBS) que contiene NGtS al 1 % durante 30 minutos a temperatura ambiente; (vii) se lavan los portaobjetos en suero regulado con fosfato (PBS) 0.01 M, pH de 7.4; (viii) se incuban con estreptavidina/HRP (Vector Laboratories, Inc. EUA) en suero regulado con fosfato (PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente, (ix) se revela la actividad de HRP con AEC+ (DakoCytomation Corp., Carpintería, EUA) durante 8 a 10 minutos, controlando la intensidad del teñido microscópicamente, se lava en agua destilada, (x) se contra-teñe con Dako (RTM) Automation Hematoxilina (DakoCytomation Corp., Carpintería, EUA) durante 2 minutos y de azul en agua del grifo corriente durante 5 minutos; (xi) se monta con un medio de montaje acuoso (Mediate Medizintechnik AG, Suiza).

Ejemplo 1: Evaluación de la actividad agonista de los mAb1, mAb2 y mAb3

Los datos experimentales se basan en el uso de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humanas primarias no fraccionadas aisladas. Las preparaciones de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) enteras (en lugar de las células B aisladas o los monocitos) imitan más estrechamente la situación *in vivo* en donde un mAb anti-CD40 podría tener múltiples efectos directos e indirectos sobre diferentes tipos de células de leucocitos. Utilizando este ensayo de proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), se determinó que los mAbs aglicosilados mAb1 anti-CD40 (N297A) y mAb2 (D265A), los cuales conservaron la secuencia de aminoácidos de la porción de enlace de antígeno sin cambios a partir del anticuerpo progenitor Chir12.12, conservaron las propiedades de bloqueo de CD40L no agonistas del mAb Chir12.12 progenitor. El anticuerpo mAb3 (LALA mutante) fue débilmente agonista en la presencia de la IL-4.

En particular, los resultados experimentales muestran que ninguno de los mAbs anti-CD40 de Fc silencioso fue capaz de estimular la división celular mediante las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humanas (n = 4 donadores), un resultado similar a aquél observado con el mAb Chir12.12 progenitor (Véase la Figura 1). Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) proliferaron en respuesta al CD40L. Cualquiera del mAb1 o el mAb2 pudo mejorar la proliferación inducida por CpG2006 o por el F(ab')₂ anti-IgM de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) (Figura 2). Además el Chir12.12 fracasó para mejorar la proliferación inducida por el F(ab')₂ anti-IgM de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs); sin embargo a diferencia de mAb1 y mAb2, inhibió completamente la proliferación de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) inducida por CpG.

En la presencia de IL-4, se observó el mAb3 (mutación LALA) con el objeto de inducir niveles bajos pero reproducibles (n = 4 donadores) de incorporación de timidina por encima de aquél inducido por la IL-4 sola, mientras que mAb1, mAb2 y Chir12.12 no lo hicieron (Figura 3). Colectivamente, estos resultados indicaron que, con la excepción del mAb3 (en la presencia de IL-4), ninguno de los mAbs anti-CD40 tuvo actividad agonista alguna.

Los resultados anteriores también demostraron claramente que los mAb1 y mAb2 no tuvieron actividad agonista en la presencia de señales co-estimulantes. Éste es un hallazgo importante, debido a que es probable que los leucocitos en un paciente con enfermedad autoinmune crónica tengan un fenotipo activado o parcialmente activado y, por consiguiente, sean sensibilizados a la señalización por medio de CD40 u otros estímulos. Se observó que el Chir12.12 (pero no los mAbs de Fc silenciosos o el CD40L) inhibió completamente la proliferación de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) inducida por CpG2006. CpG2006 es un ligando sintético para el receptor 9 tipo-Toll (TLR9), un receptor que ha demostrado que se enlaza al ssADN patógeno y derivado del huésped. En los seres humanos, TLR9 es expresado por las células B y (hasta un menor grado) por los monocitos de la sangre periférica. Debido a que anteriormente se ha demostrado que los ODNs que contienen CpG mejoran la ADCC (Moga y colaboradores, 2008), se puede especular que el CpG2006 es capaz de mejorar la ADCC mediada por la porción Fc de IgG1 de la línea germinal del mAb Chir12.12 progenitor.

Ejemplo 2: Evaluación de la capacidad de los mAbs anti-CD40 de Fc silenciosos para bloquear la proliferación de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediada por el CD40L

Los datos anteriores indicaron que el Chir12.12 podría bloquear la proliferación mediada por el CD40L de las células B primarias humanas y de las líneas celulares de linfoma de células B humanas. Medimos la inhibición de la proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) mediada por el CD40L mediante Chir12.12 y los tres anticuerpos de acuerdo con la invención mAb1, mAb2, mAb3. La Tabla 7 más adelante presenta los valores IC50 para esta inhibición, tabulados en miligramos/mililitro (los resultados se presentan como el promedio de los cultivos triplicados con el SEM, y son representativos de 4 donadores, en experimentos independientes). Los resultados demuestran que Chir12.12 también puede inhibir la proliferación de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) mediada por el CD40L. Adicionalmente, los mAb1, mAb2 y mAb3 también bloquearon completamente la división de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) mediada por el CD40L con una potencia similar a la del Chir12.12. Ninguno de los mAbs anti-CD40 bloqueó la proliferación de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) inducida por anti-IgM + IL-2 (no se muestran los datos), sugiriendo que la actividad de bloqueo de los mAbs anti-CD40 era dependiente del objetivo (y no estaba relacionada con la función del Fc).

Tabla 7

Valores IC50 para la inhibición mediada por el mAb anti-CD40 de la proliferación de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) (microgramos/mililitro)

Anticuerpo	IC50
Chir12.12 (wt Fc)	0.176

Anticuerpo	IC50
mAb1 (N297A)	0.058
mAb2 (D265A)	0.146
mAb3 (LALA)	0.118

Ejemplo 3: Enlace de las variantes del anticuerpo anti-CD40 humano a la línea celular BJAB humana

5 Con el fin de excluir los posibles cambios en el enlace específico al CD40, se probó el enlace de las tres variantes mAb1, mAb2 y mAb3 en comparación con el Chir12.12 progenitor sobre una línea de células B, BJAB, la cual expresa constitutivamente el CD40. El enlace se probó en una titulación de la dosis empezando en 10 microgramos/mililitro a una dilución de 1:2.

10 Con el objeto de comparar las curvas de los diferentes experimentos, la intensidad de fluorescencia más alta promedio de cada titulación de dosis individual se estableció en el 100 % de enlace, y se aplicó un ajuste de curva no lineal. En dos experimentos separados, las cuatro variantes de anticuerpos Chir12.12, mAb1, mAb2 y mAb3 mostraron curvas de enlace equivalentes sobre las células BJAB (Figura 5). No se pudieron observar cambios en las capacidades de enlace de las variantes con las diferentes mutaciones de la región de enlace Fc del Chir12.12.

Los resultados anteriores, por consiguiente, demostraron que la mutación del sitio de enlace Fc no tuvo impacto alguno sobre el sitio de enlace del CD40 de las regiones variables del Chir12.12 progenitor. Los mAb1, mAb2 y mAb3 conservaron un enlace equivalente de CD40 sobre las células BJAB.

15 **Ejemplo 4:** Estimulación/Inhibición de la liberación del TNF-alfa a partir de las células dendríticas derivadas de monocitos humanos, mediante las variantes de Fc anti-CD40

Estimulación de la liberación del TNF-alfa a partir de las MoDCs humanas, mediante las variantes de Fc anti-CD40

20 Se ha demostrado que algunos anticuerpos anti-CD40 humano tienen efectos agonistas sobre diferentes poblaciones de células (Gruber 1989). Con el fin de excluir que las variantes de Fc mAb1, mAb2, mAb3 y Chir12.12 conducen a la activación de las MoDCs, investigamos si los anticuerpos por sí mismos inducen la liberación del TNF α cuando se incuban durante 48 horas con las células. En contraste con el ensayo de antagonista, se cultivaron las MoDCs humanas de siete días de edad durante 48 horas solamente en la presencia de las cuatro variantes anti-CD40, en una curva de respuesta a la dosis, empezando en 10 microgramos/mililitro. Subsiguientemente, se probaron los sobrenadantes para determinar la cantidad de TNF α mediante un ELISA. Ninguna de las cuatro variantes anti-CD40 mAb1, mAb2, mAb3 y Chir12.12j indujo la liberación del TNF α a partir de las MoDCs, comparándose con la estimulación con el CD40L como un control positivo (no se muestran los datos). No se pudo observar ninguna dependencia de la dosis con ninguna de las cuatro variantes de anticuerpos. Las cantidades del TNF α no se elevaron de una manera significativa por encima del nivel de las MoDCs no estimuladas (no se muestran los datos). Por consiguiente, se pudo excluir una actividad agonista de estos cuatro anticuerpos.

30 **Inhibición de la liberación del TNF-alfa a partir de las MoDCs humanas mediante las variantes de Fc anti-CD40**

35 El anticuerpo Chir12.12 progenitor bloquea la interacción de CD40-CD40L y, por consiguiente, también debe bloquear la activación celular. La estimulación de CD40 sobre las células dendríticas derivadas de monocitos humanos con los trimeros de CD40L conduce, por ejemplo, a la liberación de las citoquinas pro-inflamatorias como TNF α (Ma 2009). Nuevamente, el cambio en la región Fc no debe impactar la función de bloqueo de las variantes en comparación con el Chir12.12. Los cuatro anticuerpos deben inhibir la liberación del TNF α mediada por el CD40L a partir de las MoDCs humanas con una IC50 equivalente.

40 Por consiguiente, las MoDCs humanas de siete días de edad se estimularon durante 24 horas con MegaCD40L, una doble construcción recombinante trimérica, en la presencia de las cuatro variantes anti-CD40 bloqueadoras. Subsiguientemente, se probaron los sobrenadantes para determinar la cantidad de TNF α mediante un ELISA. Las variantes mAb1, mAb2 y mAb3 mutadas por Fc mostraron la misma inhibición de respuesta a la dosis que el Chir12.12 en tres experimentos separados (no se muestran los datos). Los resultados preliminares también muestran una inhibición similar de la liberación de IL-23 a partir de las MoDCs humanas (no se muestran los datos).

45 Se aplicó un ajuste de curva no lineal para estimar la IC50 de los cuatro anticuerpos y se calculó la IC50 promedio a partir de los experimentos. La IC50 promedio de las cuatro variantes para la liberación del TNF α a partir de las MoDCs humanas, está en el intervalo de entre 32 nanogramos/mililitro y 40 nanogramos/mililitro (Tabla 8). En

resumen, las mutaciones en la región Fc no tuvieron impacto alguno sobre los efectos antagonistas de las variantes de anticuerpos.

Tabla 8

IC50 de las diferentes variantes de Fc para la inhibición del TNF-alfa

	#1	#2	#3	Promedio	SEM
Chir12.12	n.c.	41	30	36	4
mAb1	23	44	58	40	10
mAb2	41	12	42	33	10
mAb3	39	8	47	32	12

5

IC50 en nanogramos/mililitro para las diferentes variantes de Fc del CD40 anti-humano a partir de tres experimentos independientes. El ajuste de curva no lineal en el #1 para el Chir12.12 no permitió hacer una estimación válida de la IC50 (n. c. = no calculado).

10 Por consiguiente, los resultados anteriores muestran que las cuatro variantes fueron inactivas para inducir la liberación del TNF α a partir de las MoDCs. Más importante, todas las variantes mAb1, mAb2 y mAb3 inhibieron la producción de citoquina mediada por el CD40L por parte de las MoDCs humanas, con una eficacia similar *in vitro* comparándose con el Chir12.12.

Ejemplo 5: Compendio de los datos

15 La siguiente Tabla 9 resume algunas de las propiedades importantes de los anticuerpos mAb1, mAb2 y mAb3 de la divulgación, en comparación con el anticuerpo Chir12.12 progenitor.

Tabla 9

Datos Comparativos

Criterio de Selección	Chir 12.12	mAb1	mAb2	mAb3
Enlace de Abs anti CD40 humano (Biacore, Kd nM)	0.55	0.69	0.49	0.33
Actividad de ADCC (lisis específica normalizada)	100 %	<1 %	<1 %	40 %
Actividad agonista sobre las huPBMCs (EC50, ng/ml)	>10000	>10000	>10000	>10000
Inhibición de CD40L – huPBMCs (IC ₅₀ , ng/ml)	13	15	17	15
T _{1/2} (días) – PK de Rata (10 ml/kg)	9.3+/-0.90	8.8+/-0.49	11.6+/-2.3	n.d

20 **Ejemplo 6:** Breve descripción de las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos útiles para la práctica de la invención

ES 2 633 817 T3

SEQ ID NO:	Descripción de la secuencia
1	Secuencia de aminoácidos HCDR1 de Chir-12.12, mAb1, mAb2, mAb3
2	Secuencia de aminoácidos HCDR2 de Chir-12.12, mAb1, mAb2, mAb3
3	Secuencia de aminoácidos HCDR3 de Chir-12.12, mAb1, mAb2, mAb3
4	Secuencia de aminoácidos LCDR1 de Chir-12.12, mAb1, mAb2, mAb3
5	Secuencia de aminoácidos LCDR2 de Chir-12.12, mAb1, mAb2, mAb3
6	Secuencia de aminoácidos de LCDR3 Chir-12.12, mAb1, mAb2, mAb3
7	Secuencia de aminoácidos VH de Chir-12.12, mAb1, mAb2, mAb3
8	Secuencia de aminoácidos VL de Chir-12.12, mAb1, mAb2, mAb3
9	Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de longitud completa de Chir-12.12
10	Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de longitud completa de Chir-12.12
11	Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de longitud completa del mAb1
12	Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de longitud completa del mAb1
13	Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de longitud completa del mAb2
14	Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de longitud completa del mAb2
15	Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de longitud completa del mAb3
16	Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de longitud completa del mAb3
17	Secuencia de aminoácidos de región Fc del mAb1
18	Secuencia de aminoácidos de región Fc del mAb2
19	Secuencia de aminoácidos de región Fc del mAb3
20	ADN que codifica a la cadena pesada de longitud completa de Chir-12.12
21	ADN que codifica a la cadena ligera de longitud completa de Chir-12.12

SEQ ID NO:	Descripción de la secuencia
22	ADN que codifica a la cadena pesada de longitud completa del mAb1
23	ADN que codifica a la cadena ligera de longitud completa del mAb1
24	ADN que codifica a la cadena pesada de longitud completa del mAb2
25	ADN que codifica a la cadena ligera de longitud completa del mAb2
26	ADN que codifica a la cadena pesada de longitud completa del mAb3
27	ADN que codifica a la cadena ligera de longitud completa del mAb3
28	Secuencia de aminoácidos del CD40 humano

Ejemplo 7: Secuencias de aminoácido y de nucleótidos útiles para la práctica de la invención

SEQ ID NO:	Secuencias detalladas de aminoácidos o de nucleótidos
1	SYGMH
2	VISYEESNRYHADSVKG
3	DGGIAAPGPDY
4	RSSQSLLYSNGYNYLD
5	LGSNRAS
6	MQARQTPFT
7	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAV ISYEESNRYHADSVKGRFTISRDN SKITLYLQMNSLRTEDTAVYYCARDGGIAA PGPDYWGQGTLVTVSS
8	DIVMTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQVLI SLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQARQTPFTFG PGTKVDIR
9	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAV ISYEESNRYHADSVKGRFTISRDN SKITLYLQMNSLRTEDTAVYYCARDGGIAA PGPDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPASKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTVL KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ES 2 633 817 T3

SEQ ID NO:	Secuencias detalladas de aminoácidos o de nucleótidos
10	DIVMTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQVLI SLGSNRASGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQARQTPFTFG PGTKVDIRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
11	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAV ISYEESNRYH ADSVKGRFTI SRDNSKITLY LQMNSLRTE TAVYYCARDGGIAAPGPDYW GQGLTVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVK KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYASTYRVVSVLT VLNQDQWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPKVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSV MHEALHNHYT QKLSLSLSPGK
12	DIVMTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDW YLQKPGQSPQVLI SLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCMQARQTPFTFGPGTKVD IRRRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSLSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
13	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKGLEWVAVISYEESNRYH ADSVKGRFTI SRDNSKITLY LQMNSLRTE TAVYYCARDGGIAAPGPDYW GQGLTVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG
	GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVK KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSDHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLNQDQWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPKVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSV MHEALHNHYT QKLSLSLSPGK
14	DIVMTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDW YLQKPGQSPQVLI SLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCMQARQTPFTFGPGTKVD IRRRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSLSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
15	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKGLEWVAVISYEESNRYH ADSVKGRFTI SRDNSKITLY LQMNSLRTE TAVYYCARDGGIAAPGPDYW GQGLTVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVK KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLNQDQWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPKVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSV MHEALHNHYT QKLSLSLSPGK

ES 2 633 817 T3

SEQ ID NO:	Secuencias detalladas de aminoácidos o de nucleótidos
16	<p>DIVMTQSPLS LTVTPGEPAS ISCRSSQSLL YSNGYNYLDW YLQKPGQSPQVLISLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCMQARQTPFTFGPGTKVD IRRVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNREGC</p>
17	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK</p>
18	<p>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK</p>
19	<p>APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK</p>
20	<p>CAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGG TCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGG CATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC AGTTATATCATATGAGGAAAGTAATAGATACCATGCAGACTCCGTGAAGGG CCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGATCACGCTGTATCTGCAAT GAACAGCCTCAGAACTGAGGACACGGCTGTGTACTGTGCGAGAGATG GGGGTATAGCAGCACCTGGGCCTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGT CACCGTCTCCTCAGCAAGTACCAAGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGC CCGCTAGCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCC CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACT</p>

ES 2 633 817 T3

SEQ ID NO:	Secuencias detalladas de aminoácidos o de nucleótidos
	<p>CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGGA AGCCAGGCTCAGCGCTCCTGCCTGGACGCATCCCGGCTATGCAGTCCCA GTCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCGTCTGCCTTTTACCCGGAGGCCTC TGCCCGCCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTTCCCCAG GCTCTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCTAACCAGGCCCTGCACACA AAGGGGCAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGA CCCTGCCCCTGACCTAAGCCCACCCCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTC AGCTCGGACACCTTCTCTCCTCCAGATTCCAGTAACTCCCAATCTTCTCT CTGCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCA GGTAAGCCAGCCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCC CTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGT CCACCTCCATCTCTTCTCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTC TTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC TGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCTC ACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCC AAAGGTGGGACCCGTGGGGTGCAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCT CGGCCACCCTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTA CAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGA GGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA</p>
21	<p>GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGACCGTCACCCCTGGAGA GCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCCAGTCAGAGCCTCCTGTATAGTAATG GATACTAATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAG GTCCTGATCTCTTTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTT CAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGG AGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCGACAAACTCCA TTCACTTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAGACGAACTGTGGCTGC ACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC TGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGT ACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGT GTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG GAGAGTGT</p>

ES 2 633 817 T3

SEQ ID NO:	Secuencias detalladas de aminoácidos o de nucleótidos
22	<p>CAGGTGCAGCTGGTGGAACTCTGGCGGCGGAGTGGTGCAGCCTGGCCGG TCCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCTCCGGCTTACCTTCTCCAGCTACGG CATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGGCC GTGATCTCCTACGAGGAATCCAACAGATACCACGCTGACTCCGTGAAGGG CCGGTTCACAATCTCCCGGGACAACCTCCAAGATCACCTGTACCTGCAGA TGAATCCCTGCGGACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGA CGGAGGAATCGCCGCTCCTGGACCTGATTATTGGGGCCAGGGCACCTG GTGACAGTGTCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCTCTGG CCCCCTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGCACCGCCGCTCTGGGCTGCCT GGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACCTCTGGC</p>
	<p>GCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGTCCTCCG GCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCCCTCTAGCTCTCTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGT GGACAAGCGGGTGGAAACCAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCC CCCTGCCCTGCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTTCCCTGTTCCC CCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACC TGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTG GTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGACAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAG GAACAGTACGCCTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGTCTGC ACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAG GCCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGC CCCGCGAGCCACAGGTGTACACACTGCCCCCGAGCCGGGAAGAGATGAC CAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCTCCG ATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAACAATACTCAA GACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCA AGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTG CTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGT CCCTGAGCCCCGGCAAG</p>
23	<p>GACATCGTGATGACCCAGTCCCCCCTGTCCCTGACCGTGACACCTGGCG AGCCTGCCTCTATCTCCTGCAGATCCTCCCAGTCCCTGCTGTACTCCAAC GGCTACAACCTGACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCACA GGTGTGATCTCCCTGGGCTCCAACAGAGCCTCTGGCGTGCCCGACCGG TTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTCACTGAAGATCTCACGGGT GGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCATGCAGGCCCGGCAGACC CCCTTACCTTCGGCCCTGGCACCAAGGTGGACATCCGGCGTACGGTGG CCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAG CGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCGGGAG GCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCC AGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAG CAGCACCTGACCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTAC GCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCT TCAACAGGGGCGAGTGC</p>

SEQ ID NO:	Secuencias detalladas de aminoácidos o de nucleótidos
24	<p>CAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCGGAGTGGTGCAGCCTGGCCGG TCCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACGG CATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGGCC GTGATCTCCTACGAGGAATCCAACAGATACCACGCTGACTCCGTGAAGGG CCGGTTCACAATCTCCCGGGACAACCTCCAAGATCACCTGTACCTGCAGA TGAACTCCCTGCGGACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGA CGGAGGAATCGCCGCTCCTGGACCTGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTG GTGACAGTGTCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCTCTGG CCCCCTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGCACCGCCGCTCTGGGCTGCCT GGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAAGTCTGGC GCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGTCTCCG GCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCCCTCTAGCTCTCTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGT GGACAAGCGGGTGGAAACCAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCC CCCTGCCCTGCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTTCCCTGTTCCC CCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACC TGCCTGGTGGTGGCCGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATT GGTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGA GGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGTGC ACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAG GCCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGC</p>
	<p>CCCGCGAGCCACAGGTGTACACACTGCCCCCGAGCCGGGAAGAGATGAC CAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCTCCG ATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAACAACATAAA GACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACTCCA AGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTG CTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGT CCCTGAGCCCCGGCAAG</p>
25	<p>GACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTGTCCCTGACCGTGACACCTGGCG AGCCTGCCTCTATCTCCTGCAGATCCTCCCAGTCCCTGCTGTACTCCAAC GGCTACAACCTGGACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCACA GGTGTGATCTCCCTGGGCTCCAACAGAGCCTCTGGCGTGCCCGACCGG TTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTCACACTGAAGATCTCACGGGT GGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCATGCAGGCCCGGCAGACC CCCTTACCTTCGGCCCTGGCACCAAGGTGGACATCCGGCGTACGGTGG CCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAG CGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCGGGAG GCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCC AGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAG CAGCACCTGACCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTAC GCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCT TCAACAGGGGCGAGTGC</p>

SEQ ID NO:	Secuencias detalladas de aminoácidos o de nucleótidos
26	<p>CAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCGGAGTGGTGCAGCCTGGCCGG TCCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCTCCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACGG CATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGACTGGAATGGGTGGCC GTGATCTCCTACGAGGAATCCAACAGATACCACGCTGACTCCGTGAAGGG CCGGTTCACAATCTCCCGGGACAACCTCCAAGATCACCTGTACCTGCAGA TGAACTCCCTGCGGACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGA CGGAGGAATCGCCGCTCCTGGACCTGATTATTGGGGCCAGGGCACCTTG GTGACAGTGTCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCTCTGG CCCCTTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGCACAGCTGCTCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAAGTCTGGCG CCCTGACCTCTGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCCTCCGG CCTGTAATCCCTGTCTCCGTGGTCAAGTGCCTTCAAGCAGCCTGGGCA CCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTG GACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTC CCTGCCCTGCTCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCCCTGTTCCCT CCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTG CGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGATCCTGAAGTGAAGTTCATTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGG AACAGTACAACCTCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCAC CAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGC CCTGCCTGCCCTATCGAAAAGACAATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTA GGGAACCCAGGTGTACACCCTGCCACCCAGCCGGGAGGAAATGACCAA GAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATA TCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGAC CACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCCTGTAATCCAAC TGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTC CGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCC TGTCTCCCGGCAAG</p>
27	<p>GACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTGTCCCTGACCGTGACACCTGGCG AGCCTGCCTCTATCTCCTGCAGATCCTCCAGTCCCTGCTGTACTCCAAC GGCTACAACCTGACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCACA GGTGCTGATCTCCCTGGGCTCCAACAGAGCCTCTGGCGTGCCCGACCGG</p>
	<p>TTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTCACACTGAAGATCTCACGGGT GGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCATGCAGGCCCGGCAGACC CCCTTACCTTCGGCCCTGGCACCAAGGTGGACATCCGGCGTACGGTGG CCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAG CGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAG GCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCC AGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAG CAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTAC GCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCT TCAACAGGGGCGAGTGC</p>

SEQ ID NO:	Secuencias detalladas de aminoácidos o de nucleótidos
28	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCT EFTETECLPCGESEFLDT WNRETHCHQHXYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCVL HRSCSPGFGVKQIATGVSD TICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCGPQDRL RALVVIPIIFGILFAILL VLVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQ EDGKESRISVQERQ

Ejemplo 8: Resultados de toxicología

El objetivo primario del estudio de toxicología fue determinar la toxicidad del mAb1, en seguida de la administración intravenosa una vez por semana al mono cinomolgo durante 5 semanas (6 aplicaciones del artículo de prueba). También se utilizó la versión no silenciosa (ADCC) de este anticuerpo (Chir12.12), con el objeto de comparar los efectos de un anticuerpo con actividad ADCC con la versión silenciosa de ADCC (mAb1).

En adición, los animales se inmunizaron con KLH con el objeto de evaluar la eficacia de ambos Abs anti-CD40.

No hubo mortalidades o cambios en los pesos corporales, en los signos clínicos, ni en el consumo de alimento estimado atribuible al tratamiento con mAb1 o Chir12.12. Las reacciones locales en los sitios de inyección de KLH fueron comparables en todos los grupos.

También, no hubo hallazgos relacionados con los artículos de prueba en las investigaciones oftálmicas y cardiovasculares.

En la hematología, se observó una disminución ligera pero estadísticamente significativa en el porcentaje y en los números absolutos de los basófilos en los animales tratados con el mAb1 y el Chir12.12: no se puede excluir una relación con el tratamiento con el artículo de prueba. El análisis de orina reveló cetonas en la orina de 1/5 hembras tratadas con el mAb1 y de 2/5 hembras tratadas con el Chir12.12, con una relación poco clara con la dosificación. En la química clínica, se observó una ligera tendencia a tener concentraciones elevadas de lipasa para los machos tratados con el Chir12.12, así como para una hembra tratada con el Chir12.12; sin embargo, esto se consideró como de una relevancia toxicológica limitada.

La coagulación sanguínea no fue afectada por el tratamiento con mAb1 o Chir12.12, como fue evaluado por el tiempo de protrombina, el tiempo de protrombina parcial activada, y el fibrinógeno. Los recuentos de plaquetas parecieron estar en el intervalo normal. Las concentraciones de P-selectina o sCD40L en plasma no indicaron ninguna activación de plaquetas.

En los animales tratados con el Chir12.12, la inmunofenotipificación mostró una disminución prominente en las células B CD20⁺, que era la acción farmacológica esperada de este anticuerpo. En especial las células B CD20^{baja}CD21⁺ (las cuales se consideran como CD40^{alta}) fueron consumidas por el Chir12.12. Sin embargo, también las células B CD20^{alta}CD21⁻ disminuyeron sustancialmente, en especial hacia el final del estudio. De preferencia, las células B puras CD20⁺CD21⁺CD27⁻ fueron consumidas por el anticuerpo Chir12.12 con actividad de ADCC, mientras que las células B de memoria CD20⁺CD21⁺CD27⁺ difícilmente fueron afectadas. También hubo una disminución aproximada del 50 % en el número absoluto de células-NK CD16⁺ en los animales tratados con el Chir12.12. Como se esperaba, en seguida del tratamiento con el mAb1 (el cual es ADCC-silencioso), no se observó la disminución prominente en las células B CD20⁺, ni hubo disminución alguna en los números absolutos de células-NK CD16⁺. Las únicas células B que mostraron una reducción moderada durante la dosificación fueron las células B CD20^{alta} CD21⁻. Estas células son conocidas como específicas de macaco, y de un origen germinal central y, por consiguiente, este hallazgo no se considera relevante para su transición a los seres humanos.

La inmunofenotipificación del bazo y de los ganglios linfáticos que drenan KLH en la necropsia, reveló un cuadro similar. Hubo una disminución en el número relativo de células B CD20⁺ en los animales tratados con el Chir12.12; sin embargo no se observó ninguna reducción relevante de las células B CD20⁺ para los animales tratados con el mAb1, con una reducción ligera a moderada de las células B CD21⁻ (ganglios linfáticos de ambos sexos, bazo de machos solamente). No hubo diferencias en los resultados de la inmunofenotipificación para el drenado de los ganglios linfáticos derecho e izquierdo en el sitio de inyección de KLH.

La reacción de los anticuerpos dependiente de las células T (TDAR) mostró que, en comparación con el grupo de control, no se observó respuesta alguna de IgG e IgM a la KLH en los animales tratados con mAb1 o Chir12.12. Debido a que el bloqueo de la activación de las células B mediante la inhibición de la interacción de ligandos CD40 -

CD40 es la acción farmacológica pretendida del mAb1, y debido a que el Chir12.12 pretende consumir las células B, este hallazgo o se considera como toxicológicamente relevante.

La evaluación toxicocinética reveló que las concentraciones de artesa aumentaron durante el transcurso del estudio, indicando la acumulación de mAb1 y Chir12.12. Las concentraciones de artesa promedio después de la 4ª y 5ª dosis fueron similares, indicando condiciones de estado casi continuo después de la 5ª dosis para el mAb1 y el Chir12.12. Las exposiciones promedio (ambos géneros) durante el intervalo de dosificación (AUC_T) después de la 4ª y 5ª dosis, fueron de 906 y 990 h.mg/mL, respectivamente para el mAb1, y de 757 y 751 h.mg/mL, respectivamente para el Chir12.12. Los valores de AUC_T también indicaron condiciones de estado casi continuo después de la 5ª dosis.

Los exámenes macroscópicos no mostraron evidencia alguna de la toxicidad del órgano objetivo, y los pesos de los órganos también estuvieron dentro del intervalo normal para esta especie.

Microscópicamente, se vieron hallazgos relacionados con el artículo de prueba de ambos anticuerpos en todos los órganos linfáticos (bazo y ganglios linfáticos (mesentéricos, mandibulares, axilares, e inguinales)), en donde el mAb1 y el Chir12.12 provocaron una supresión completa del desarrollo del centro germinal en las áreas de las células B corticales. El inmunotendido de CD20 del bazo y el drenado de KLH, y el tejido del ganglio linfático contralateral, mostraron un tamaño reducido de los folículos linfoides en el bazo, así como un agotamiento de células B en el bazo y en los ganglios linfáticos, un efecto que fue mucho más pronunciado en los animales tratados con el Chir12.12, comparándose con el tratamiento con el mAb1. Los hallazgos de centros germinales en los animales tratados con el mAb1 corresponden a la reducción de las células B CD21⁺ que se ve en la inmunofenotipificación. El inmunotendido de CD40 mostró una reducción significativa en el tendido de CD40 en los ganglios linfáticos y en el bazo en seguida del tratamiento con cualquiera de mAb1 o Chir12.12.

En conclusión, basándose en los resultados de este estudio, la administración intravenosa una vez por semana del mAb1 o del Chir12.12 durante 5 semanas (6 administraciones) en una concentración de 100 mg/kg, a los monos cinomolgos machos y hembras, fue bien tolerada. La inmunofenotipificación mostró un consumo de células B en los animales tratados con el Chir12.12 pero no en los animales tratados con el mAb1, con la excepción de las células B CD21⁺; sin embargo, el TDAR mostró una ausencia de reacción de IgG e IgM después de la inmunización con KLH tanto en los animales tratados con el mAb1 como con el Chir12.12. La histopatología reveló la falta de centros germinales en el bazo y en los ganglios linfáticos a partir de los animales tratados con el mAb1 y con el Chir12.12. Los efectos sobre las células B son las acciones farmacológicas deseadas y, por consiguiente, no se consideran adversos. Se considera que el nivel del efecto adverso no observable (NOAEL) está en la dosis de 100 mg/kg tanto para el mAb1 como para el Chir12.12, bajo las condiciones de este estudio.

Ejemplo 9: Perfilación adicional *in vitro* del mAb1

Se determinó el enlace y la reactividad funcional cruzada del mAb1 entre los leucocitos humanos, y de monos rhesus y cinomolgos. La Tabla 10 muestra una comparación directa de las EC50s de enlace para el mAb1 en las tres especies.

Tabla 10
Reactividad cruzada del mAb1 humano y de NHP

Ensayo	Humano	Rhesus	Cinomolgo
Enlace de CD40 (células B CD20+ – FACS) (EC ₅₀ , µg/ml)	0.26, 0.28	0.22+/-0.033 (n=6)	0.3, 0.24
Inhibición de CD154 (células B humanas y PBMCs) (IC ₅₀ , µg/ml)	0.058, 0.075 (células B de amígdalas humanas)	0.03+/-0.017 (n = 6) (PBMCs)	0.015, 0.02 (PBMCs)

El mAb1 se enlaza a las células CD20+ (células B) de las tres especies con una EC50 comparable. Adicionalmente, el mAb1 pudo inhibir la proliferación de las células B de amígdalas humanas inducida por CD154+IL-4, así como las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) a partir de mono cinomolgo y rhesus. Colectivamente, estos resultados indicaron que la capacidad del mAb1 para enlazarse a CD40 y para inhibir la proliferación de las células B humanas o las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de primate no humano, fue muy similar. Los

datos de la disponibilidad de la ocupación *in vitro* del receptor (RO) y la inhibición funcional, hicieron posible determinar la relación entre estas dos variables para cada especie (Tabla 11).

Tabla 11
Relación entre el RO de mAb1 y la inhibición funcional

	IC ₅₀ en la prueba de inhibición funcional ^a (µg/mL)	RO <i>in vivo</i> correspondiente ^{b,c} (%)
Rhesus	0.02551	22.9
Humano	0.067	43.8

^a Proliferación inducida por CD154 Soluble + IL4 en mono rhesus con células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y en el ser humano con células B de amígdalas.

^b asumiendo la farmacodinamia (KD) *in vivo* en mono rhesus y en el ser humano, es la misma que la calculada en el estudio de farmacocinética (PK)/farmacodinamia (PD) en el mono cinomolgo.

^c asumiendo que el mAb1 está bien por encima del [objetivo], es aplicable la ecuación de Hill-Langmuir.

5

Los resultados indican que las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de mono rhesus con el mAb1 requieren aproximadamente 2 veces menos RO para inhibir la proliferación de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) por el 50 % en comparación con las células B humanas. En el ser humano, se pudo obtener la inhibición completa con aproximadamente el 75 % (predicho *in vivo*) de RO.

10 **Ejemplo 10:** Estudio de Trasplante

Sobrevivencia del injerto

El tratamiento de combinación con el mAb1 (30 mg/kg intravenosamente (i.v.)), y ciclosporina A (20 mg/kg oralmente) durante el trasplante de aloinjerto de riñón, dio como resultado una prolongación significativa de la supervivencia de los 6 animales involucrados en el estudio. Los injertos fueron funcionales durante >91*, 31, >92*, >92*, >98* y >98* días (promedio: >83.6 días) en los animales #5529, #5533, #5523, #5524, #5536 y #5538, respectivamente (* final del protocolo). La supervivencia en los animales no tratados (o tratados con dosis IS sub-terapéuticas) estuvo en el intervalo de 7 a 10 días (datos históricos).

El animal #5533 se sometió a eutanasia 31 días después del trasplante, debido a falla aguda del riñón y anuria. Esta patología apareció después de un período de hipertensión mantenida y de la anestesia para la recolección de la biopsia.

20 Monitorización después del trasplante

(a) Concentraciones en suero de creatinina (SCrea) y urea (SUrea)

SCrea fue el parámetro principal utilizado para la evaluación de la función renal. En los 6 animales, los niveles de SCrea aumentaron por encima del valor de los niveles iniciales un día después del trasplante (de 81.8 ± 14.6 a 221.5 ± 37.1 micromoles/litro). Esta elevación en la SCrea es una característica común durante la primera semana después del trasplante (Tabla 12).

25

Tabla 12

Cambios en la SCrea observada en los receptores de aloinjerto de riñón NHP tratados con el mAb1 y con la terapia de combinación con CsA a 30 y 20 mg/kg, respectivamente

Días después del trasplante	Nivel de SCrea ($\mu\text{mol/l}$)					
	#5536	#5538	#5523	#5524	#5529	#5533
-4	101	109	85	73	81	86
-1	106	89	80	71	95	76
0	95	105	74	72	76	69
1	234	238	213	198	277	169
3	190	261	148	155	243	191
7	112	189	136	141	110	110
10	111	172	193	206	102	139
14	101	166	209	165	103	156
17	113	181	277	157	94	175
21	114	162	192	117	111	206
24	112	156	155	124	111	191
28	95	133	119	111	100	170
31	95	139	119	106	122	629
35	103	135	110	100	104	
38	104	128	111	109	108	

ES 2 633 817 T3

Días después del trasplante	Nivel de SCrea (μmol/l)					
	#5536	#5538	#5523	#5524	#5529	#5533
42	107	113	110	101	114	
45	95	124	108	115	113	
49	103	118	104	106	101	
52	107	129	105	111	102	
56	122	103	112	95	101	
59	112	105	94	97	99	
63	110	120	115	115	99	
66	103	132	110	104	107	
70	101	116	91	100	105	
73	103	124	105	120	109	
77	103	109	98	121	105	
80	103	101	102	113	109	
84	101	104	120	126	110	
87	107	103	111	112	108	
91	100	112	119	112	105	
94	117	133				

Durante la primera semana, las concentraciones de SUrea experimentaron rápidas elevaciones por encima del valor

ES 2 633 817 T3

inicial medido en el día 0 (4.5 ± 1.3 milimoles/litro) (Tabla 13). En los animales #5529/#5533 y #5536/#5538, los niveles de SÚrea fueron de 16 a 20 milimoles/litro (días 3 a 5), mientras que en los animales #5523 y #5524 fueron de 9 u 8 milimoles/litro (día 7), respectivamente.

Tabla 13

- 5 Cambios en la SÚrea observados en los receptores de aloinjerto de riñón NHP tratados con el mAb1 y con la terapia de combinación con CsA a 30 y 20 mg/kg, respectivamente

Días después del trasplante	Nivel de SÚrea (mmol/l)					
	#5536	#5538	#5523	#5524	#5529	#5533
-4	7	5	4	4	8	5
-1	7	6	5	6	9	5
0	6	4	3	4	6	5
1	14	12	7	8	13	9
3	20	17	5	6	16	15
7	9	14	9	8	9	11
10	5	10	17	14	6	11
14	6	8	18	13	5	18
17	7	10	16	8	5	15
21	7	10	14	7	4	19
24	6	9	8	6	4	17
28	8	10	11	8	4	12
31	6	9	11	8	4	18
35	7	10	8	7	6	
38	7	8	6	5	6	
42	7	9	10	7	6	
45	7	9	10	8	6	

Días después del trasplante	Nivel de SÚrea (mmol/l)					
	#5536	#5538	#5523	#5524	#5529	#5533
49	9	9	8	6	8	
52	6	8	6	6	7	
56	8	9	9	9	6	
59	4	8	9	10	8	
63	6	9	8	7	7	
66	7	11	7	7	7	
70	6	9	10	9	7	
73	7	9	9	10	5	
77	11	14	8	10	7	
80	6	7	7	8	7	
84	6	7	9	9	6	
87	6	8	8	8	6	
91	7	8	10	10	5	
94	7	8				

Una semana después del trasplante, la función renal tiende a normalizarse y SCrea/SÚrea llegan a estar más cerca de los niveles de la línea basal. Sin embargo, los animales #5533, #5523 y #5524 (pero no #5529, #5536 y #5538) presentaron un aumento adicional en SCrea/SÚrea entre los días 7 y 19 a 25 después del trasplante, indicando un mal funcionamiento renal. Durante este período, se pudieron observar signos como polidipsia/poliuria (#5523 y #5524), calcio en suero alto sostenido (SCa) (#5533), o un aumento en el volumen del injerto (#5523 y #5524).

Después del día 20-25, los animales #5529, #5523, #5524, #5536 y #5538 mejoraron y mostraron una excelente función renal hasta el final del estudio. Sin embargo, en el día 31, el animal #5533 exhibió un aumento pronunciado en los niveles de SCrea/SÚrea, confirmando una falla aguda del riñón (SCrea; 629 micromoles/litro, y SÚrea; 18 milimoles/litro). Esta patología se presentó después de un período de hipertensión sostenida y del procedimiento de la biopsia un día antes de la eutanasia. Durante este período, se registraron picos de hipertensión (aproximadamente 170 mm Hg, sistólica), y un episodio de hipotensión (aproximadamente 40 mmHg, sistólica).

(b) Concentraciones de amilasa y lipasa en suero, peso corporal, y recuentos de plaquetas

Las concentraciones de amilasa en suero aumentaron ligeramente en todos los animales por aproximadamente 1.3 veces en los días 1-7 después del trasplante (311 ± 53 Unidades/litro en el día 0, y 418 ± 66.8 Unidades/litro en el

día 7 después del trasplante) (Tabla 14). El animal #5533 presentó la concentración de amilasa más alta observada en el estudio en el día 1 después del trasplante (1,050 Unidades/litro). Antes del trasplante, no hubo diferencia alguna entre los niveles de amilasa observados antes de la primera dosis del mAb1 y 24 horas después de (día -1 y día 0).

5

Tabla 14

Concentraciones de amilasa en suero (Unidades/litro (U/L)) en los animales con trasplante de riñón tratados con una combinación de mAb1 a 30 mg/kg intravenosamente (i.v.) y CsA a 20 mg/kg oralmente (p.o.)

Tiempo después del trasplante	Amilasa promedio (U/L)	Desviación Estándar	Veces de aumento
Día 0	311	52.95	
Día 7	418.2	66.8	1.34
Día 14	459.2	71.5	1.48
Día 56	526.6	121.5	1.69
Día 84	460.4	66.8	1.48

10

Las concentraciones de lipasa en suero experimentaron, en promedio, cambios menores antes y después del trasplante (Tabla 15). Solamente al final del protocolo experimental, se pudo ver un incremento menor (día 84; 2.18 veces). El animal #5533 mostró la concentración de lipasa más alta medida en el día 1 (284.4 Unidades/litro). Los datos de lipasa a partir de los animales #5536 y #5538 no estuvieron disponibles. Los cambios en las concentraciones de amilasa y lipasa fueron similares a los niveles encontrados en otros experimentos de trasplante utilizando diferentes anticuerpos o compuestos de bajo peso molecular (no se muestran los datos).

15

Tabla 15

Concentraciones de lipasa en suero (U/L) en cuatro de los animales con trasplante de riñón tratados con una combinación de mAb1 a 30 mg/kg intravenosamente (i.v.) y CsA a 20 mg/kg oralmente (p.o.)

Tiempo después del trasplante	Lipasa promedio (U/L)	Desviación Estándar	Veces de aumento
Día 0	12	1.3	
Día 7	13.05	2.26	1.09
Día 14	12.9	1.25	1.08
Día 56	16.6	3.41	1.38
Día 84	26.2	21.06	2.18

20

Se pudo observar una rápida y notoria pérdida del peso corporal principalmente en los animales #5529, #5533 y #5536. En los seis animales trasplantados, estuvo en el intervalo del -4 al -18 % durante los primeros 21 días en seguida del trasplante. Sin embargo, la pérdida del peso corporal tendió a recuperarse después de este punto del tiempo y hacia el final del estudio.

Los recuentos de plaquetas fueron normales (de 300 a 400 células x 103/microlitro), o aumentaron durante el período después del trasplante a 600-800 células x 103/microlitro. El animal #5529 recibió un tratamiento con aspirina durante 3 días (días 7-9) debido al rápido aumento en los recuentos de plaquetas. El animal #5533 presentó una trombocitosis de largo plazo (>1000 células x 103/microlitro), y recibió el tratamiento con aspirina entre los días 7 y 26.

(c) Niveles en sangre del mAb1 y recuentos de células B

Previamente se condujo un estudio y análisis farmacocinético (PK)/farmacodinámico (PD) de referencia, en donde se dio a los monos cinomolgos una sola dosis intravenosa del anticuerpo a 10 mg/kg (no se muestran los datos). En este estudio, los perfiles de concentración contra el tiempo exhibieron una clara disposición mediada por el objetivo (TMD), demostrando un animal una eliminación más rápida comparándose con otro animal, como una consecuencia de un nivel de expresión del objetivo probablemente más alto, enfatizando la función de los niveles de expresión del objetivo en la farmacocinética (PK) reguladora. A partir de este estudio, también se estableció que, cuando las concentraciones en suero del mAb1 estuvieron por encima de aproximadamente 5 microgramos/mililitro, esto se tradujo en casi el 100 % de ocupación del receptor de CD40.

El diseño del estudio del trasplante (semanalmente y altos niveles de dosis del mAb1 - 30 mg/kg, y sin fase de recuperación/lavado) no permitió tener el mismo nivel de análisis y modelación que el estudio de farmacocinética/farmacodinamia (PK/PD) previamente conducido. No obstante, se hicieron las siguientes observaciones (resumidas en la Tabla 16); i) no se detectó el mAb1 en las muestras recolectadas antes de la primera dosis, ii) se detectó el mAb1 a través de toda la fase de dosificación, y iii) en todas las muestras recolectadas e inter-individuos, las concentraciones de artesa fueron variables (de 1,200 a 2,500 microgramos/mililitro para el cinomolgo 5524, de 1,000 a 2,000 microgramos/mililitro para el cinomolgo 5523, y de 850 a 2,400 microgramos/mililitro para el cinomolgo 5529). Todos los valores de exposición estuvieron bien por encima (de 170 a 500 veces) de la concentración necesaria para obtener la ocupación completa del receptor en el mono cinomolgo.

Tabla 16

Concentración en suero del mAb1 para el mono cinomolgo #5533, #5529, #5523 y #5524

Tiempo (días)	mAb1 (microg/mL)			
	Cino_5533	Cino_5529	Cino_5523	Cino_5524
-1	0	0	0	0
3	591	618	1315	1384
7	682	1003	1033	1135
7.01	1557	1553	2452	2669
14	925	1037	1463	1744
28	654	896	1672	1965
42		851	1770	1259
56		1896	1991	1283
70		2385	1641	2534

Tiempo (días)	mAb1 (microg/mL)			
	Cino_5533	Cino_5529	Cino_5523	Cino_5524
84		2191	1266	2402
91		2069	1066	2071

En este estudio también se evaluó la prueba de inmunogenicidad (anticuerpos anti-mAb1 de mono). Todas las muestras resultaron negativas, pero los altos niveles de mAb1 en estas muestras pudieron impedir potencialmente su detección debido a las interferencias del fármaco.

- 5 Se pudo observar un consumo parcial de las células CD20+ con el tiempo en todos los animales tratados. Se vieron observaciones similares en el estudio farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD) previamente conducido (no se muestran los datos).

Resultados de Histología

- 10 La evaluación histopatológica de los aloinjertos de riñón no reveló ningún rechazo agudo y crónico en los injertos #5523, #5524, #5529 y #5538, y los cambios del límite en el injerto #5536 que llegaron al final del experimento, es decir (los resultados resumidos en la Tabla 17). Se observaron infiltrados perivasculares o intersticiales mínimos en los animales #5523 #5524 y #5538, y una hiper celularidad glomerular mínima en el animal #5529.

Tabla 17: Resultados de Histología

No. de Animal	Muestra	Días después del trasplante	Crea/Urea	Diagnóstico
#5529	Biopsia	30	100/4	Banff: ningún rechazo
10-0001	Necropsia	91	105/5	Banff: ningún rechazo (hiper-celularidad glomerular mínima, fibrosis de íntima mínima)
				Otro: Falta de formación de GC en los órganos linfoides secundarios. Cecocolitis (B. coli).
				Ningún otro cambio relacionado con el tratamiento.
#5533	Biopsia	30	170/12	Banff: IA, fibrosis intersticial temprana difusa, vacuolización tubular.

ES 2 633 817 T3

No. de Animal	Muestra	Días después del trasplante	Crea/Urea	Diagnóstico
10-0002	Necropsia	31	629/18	Banff: Otro (dilatación tubular, infiltrados intersticiales, y fibrosis, tubulitis mínima, absceso alrededor de anastomosis, eosinófilos alrededor de uréter).
				Otro: Falta de formación de GC en los órganos linfoides secundarios. Cecocolitis (B. coli).
				Ningún otro cambio relacionado con el tratamiento.
#5523	Biopsia	No	No	
11-0001	Necropsia	92	119/10	Banff: Sin rechazo (infiltrados perivasculares mínimos, material mucoide en una vena).
				Falta de formación de GC en los órganos linfoides secundarios. Ningún otro cambio relacionado con el tratamiento.
#5524	Biopsia	No	No	
11-0002	Necropsia	92	112/10	Banff: ningún rechazo (infiltrados intersticiales multifocales mínimos),
				Falta de formación de GC en los órganos linfoides secundarios. Ningún otro cambio relacionado con el tratamiento.
#5536	Biopsia	No	No	
11-0002	Necropsia	98	104/8	Banff: Cambios del límite (infiltrados intersticiales multifocales mínimos con tubulitis focal mínima), células de plasma focal.

No. de Animal	Muestra	Días después del trasplante	Crea/Urea	Diagnóstico
				Falta de formación de GC en los órganos linfoides secundarios. Ningún otro cambio relacionado con el tratamiento.
#5538	Biopsia	No	No	
11-0002	Necropsia	98	114/9	Banff: ningún rechazo (infiltrados intersticiales multifocales mínimos presentes)
				Falta de formación de GC en los órganos linfoides secundarios. Inflamación linfocítica focal unilateral en el pulmón. Ningún otro cambio relacionado con el tratamiento.

5 El animal #5533 que se sometió a eutanasia en el día 31 después del trasplante, mostró dilatación tubular, infiltrados intersticiales, y fibrosis, pero solamente una tubulitis mínima. En adición, se encontró una infiltración eosinofílica prominente en la vecindad del uréter, y un absceso en seguida de la anastomosis. Todos estos hallazgos indicaron una mala función renal durante mucho tiempo, pero no se pudo confirmar el rechazo.

El inmunoteñido de C4d fue negativo en todos los casos.

Se observó una falta de desarrollo del centro germinal con o sin atrofia folicular en los órganos linfoides en todos los animales. Se diagnosticó cecocolitis causada por infección con *Balantidium coli* en los animales #5529 y #5533.

No se encontraron otros cambios relacionados con el tratamiento.

10 Estudio de Trasplante - discusión

La meta del estudio de trasplante fue para evaluar, en un modelo de primate no humano de rechazo de aloinjerto de riñón, los efectos benéficos del mAb1 cuando se da como una terapia de combinación con una dosis sub-terapéutica de Ciclosporina A. En adición, fue relevante para evaluar la ausencia de efectos secundarios en un modelo en el que se induce inflamación sistémica.

15 Cuando se aplicó como terapia de combinación con una dosis subterapéutica de CsA (20 mg/kg oralmente (p.o.)), el mAb1 demostró eficacia para incrementar la sobrevivencia de los aloinjertos de riñón en NHPs. La sobrevivencia promedio del injerto fue de >83.6 días, y 5 de 6 animales llegaron al final del protocolo experimental (establecido en 91 a 98 días).

20 La dirección de CD40 utilizando un anticuerpo anti-CD40 (mAb1) bloqueador no agonista, dio como resultado la prolongación de la sobrevivencia del injerto en los NHPs con trasplante de riñón o de islotes. En adición, pudimos evaluar una mejor eficacia y seguridad utilizando el mAb1 (el cual es de Fc silencioso), comparándose con el Chir12.12 anteriormente reportado (anticuerpo monoclonal anti-CD40 completamente humano del isotipo IgG1/kappa con propiedades de bloqueo del consumo y de la coestimulación de células B).

25 Durante todo el período después del trasplante, hubo una ausencia de cualesquiera sucesos de patología clínica relevantes (por ejemplo, un aumento menor en los niveles de amilasa/lipasa atribuido a la función renal deteriorada típica después del trasplante). Sin embargo, los animales #5333, #5523 y #5524 presentaron una función renal reducida entre los días 7 y 19. Este período de tiempo se caracteriza típicamente por una recuperación de los niveles de SCrea/SUrea, de la presión sanguínea, y del volumen del injerto en los animales después del trasplante.

30 En estos animales, se vieron signos de una función renal deteriorada, tal como un aumento en SCrea/SUrea (en los 3 animales), un aumento transitorio en el volumen del injerto (#5523, #5524), o polidipsia/ poliuria (#5523, #5524). Una hipótesis podría ser que estos animales desarrollaron un proceso de rechazo temprano, el cual llegó a ser

controlado después de 3 semanas de tratamiento con el mAb1. Esta anomalía en la fase temprana después del trasplante pudo haberse debido a las diferencias inducidas por el modo de acción inmunológico de una molécula (Fc silencioso) dirigida a la senda del CD40.

5 Un animal (#5533) se sometió a eutanasia en el día 31 debido a falla aguda del riñón (ningún rechazo). Este resultado fue causado por una recuperación incompleta de la función renal después del procedimiento del trasplante. Los signos que indicaron una mala función renal fueron altos niveles de SÚrea (de 11 a 19 milimoles/ litro), o concentraciones altas sostenidas de SCa (>2.8 milimoles/ litro). La pérdida del injerto terminal se aceleró por una hipertensión sostenida (>140 mmHg, sistólica) combinada con la hipotensión observada durante la anestesia aplicada durante el procedimiento de recolección de la biopsia, y los altos picos de hipertensión registrados la noche anterior a la eutanasia (aproximadamente 170 mmHg, sistólica) (Palmer BF (2002) N. Engl. J. Med; 347(16): 1256-1261). Todos estos sucesos no se podrían atribuir al tratamiento con el mAb1, y solamente a las diferencias individuales en la fase después del trasplante.

10 La alta eficacia de la terapia de combinación se pudo demostrar también histológicamente. Cinco de seis injertos mostraron una excelente calidad del injerto al final del experimento. Se observó una falta de desarrollo del centro germinal también en un experimento de trasplante con el Chir12.12. No se observaron otros cambios del tejido relacionados con el tratamiento.

15 Uno de los sobrevivientes a largo plazo (#5529) desarrolló cecocolitis causada por *Balantidium coli*. Aunque la infección es común en los macacos, y con frecuencia asintomática, la inmunosupresión puede conducir a un establecimiento de la enfermedad aguda (Schuster FL, Ramirez-Avila L, (2008) Clin. Microbiol. Rev; 21(4): 626-38). En este animal, no se observaron signos clínicos, tales como diarrea o pérdida de peso corporal.

20 Con respecto al monitorización de los recuentos de células B, se pudo observar un consumo parcial con el tiempo en todos los animales tratados. Este consumo parcial probablemente no se deba al consumo mediado por Fc activo, debido a que el mAb1 es un anticuerpo silenciado que no se enlaza al FcR ni media la ADCC *in vitro*. El consumo parcial puede ser un espejo de la falta de centros germinales, lo cual se observa en la histología al final del experimento. Este consumo parcial puede ser debido a la falta de señales de sobrevivencia.

25 En conclusión, los resultados del estudio de trasplante apoyan el uso del mAb1 como objetivos válidos para el tratamiento de rechazo de riñón en una terapia de combinación con un excelente perfil de seguridad. El excelente perfil de seguridad y la eficacia apoyan además el uso de los anticuerpos de la invención en el tratamiento de los trastornos autoinmunes y/o de los trastornos inflamatorios, y en la prevención de rechazo de trasplante mediado por la señalización de CD40 mediada por el CD40L en las células que expresan el antígeno de CD40.

Compendio

30 No se han reportado anticuerpos anti-CD40 para inducir sucesos hemostáticos en los pacientes; sin embargo, las elevaciones en las enzimas pancreáticas en los pacientes con linfoma de células B que reciben el Ab Chir12.12 anti-CD40, y el posible riesgo de pancreatitis, precluyen el uso de este anticuerpo competente en Fc anti-CD40 en la enfermedad autoinmune crónica y en el trasplante por razones de seguridad. Por consiguiente, generamos los anticuerpos de IgG1 con Fc silencioso anti-CD40 (mAb1, mAb2, y mAb3), que son incapaces de mediar la citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos (ADCC) o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), tanto *in vitro* como *in vivo*. El mAb1 fue capaz de prolongar la sobrevivencia del aloinjerto renal de primate no humano en combinación con dosis sub-terapéuticas de ciclosporina. En adición, el mAb1 fue capaz de suprimir completamente las respuestas primarias y secundarias del anticuerpo a la inmunización con un antígeno dependiente de las células T. Crucialmente, no hubo evidencia alguna de sucesos hemostáticos o de una histología pancreática anormal en el estudio ya fuera de trasplante o bien de inmunización. Colectivamente, estos resultados sugieren que el mAb1 sería un producto terapéutico seguro y eficaz, y se podría utilizar para tratar a los pacientes que padezcan de una enfermedad autoinmune impulsada por los linfocitos-B y por las células presentadoras de antígeno, o que se sometían a trasplante de aloinjerto en donde estén involucradas las interacciones de CD40-CD154 en la contribución a la patología.

Listado de secuencias

- <110> Novartis AG
- <120> Variantes de Fc silenciosas de los anticuerpos anti-CD40
- 50 <130> PAT54423
- <150> US 61/413567
- <151> 2010-11-15
- <160> 28
- <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 1

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 2

Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 11

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr
1 5 10

<210> 4

20 <211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
1 5 10 15

25 <210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
1 5

5 <210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Gln Ala Arg Gln Thr Pro Phe Thr
1 5

10

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 7

ES 2 633 817 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ile Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 8

ES 2 633 817 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Thr Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Val Leu Ile Ser Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

Arg Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Arg
 100 105 110

<210> 9

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 9

ES 2 633 817 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ile Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

ES 2 633 817 T3

Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ala Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

ES 2 633 817 T3

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 10

<211> 219

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 10

ES 2 633 817 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Thr Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Val Leu Ile Ser Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

Arg Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Arg
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 11

<211> 450

ES 2 633 817 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ile Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

ES 2 633 817 T3

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

ES 2 633 817 T3

	355		360		365												
	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
		370					375					380					
	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
	385					390					395					400	
	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
					405					410					415		
	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
				420					425					430			
	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
		435						440					445				
	Gly	Lys															
		450															

<210> 12

<211> 219

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 12

ES 2 633 817 T3

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

ES 2 633 817 T3

<210> 13

<211> 450

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 13

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ile Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

ES 2 633 817 T3

	115						120							125			
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala		
	130						135				140						
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser		
145					150					155					160		
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val		
				165					170					175			
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro		
				180				185					190				
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys		
		195					200					205					
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp		
	210					215					220						
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly		
225					230					235					240		
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile		
				245					250					255			
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Ala	Val	Ser	His	Glu		
			260					265					270				
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His		
		275					280					285					
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg		
	290					295					300						
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys		
305					310					315					320		
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu		
				325					330					335			
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr		
			340					345					350				
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu		
		355					360					365					

ES 2 633 817 T3

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 14

<211> 219

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 14

ES 2 633 817 T3

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

ES 2 633 817 T3

<210> 15

<211> 450

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 15

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ile Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

ES 2 633 817 T3

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

ES 2 633 817 T3

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 16

<211> 219

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 16

ES 2 633 817 T3

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

ES 2 633 817 T3

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 17

<211> 217

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 17

ES 2 633 817 T3

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

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

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

ES 2 633 817 T3

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

ES 2 633 817 T3

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

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

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 19

<211> 217

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 19

ES 2 633 817 T3

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160

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

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 20

ES 2 633 817 T3

<211> 1956

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 20

caggtgcagt	tggtggagtc	tgggggaggc	gtggtccagc	ctgggaggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	caccttcagt	agctatggca	tgactgggt	ccgccaggct	120
ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtggcagtt	atatcatatg	aggaaagtaa	tagataccat	180
gcagactccg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	attccaagat	cacgctgtat	240
ctgcaaatga	acagcctcag	aactgaggac	acggctgtgt	attactgtgc	gagagatggg	300
ggtatagcag	cacctgggcc	tgactactgg	ggccagggaa	ccctggtcac	cgtctcctca	360
gcaagtacca	agggcccatc	cgtcttcccc	ctggcgcccc	ctagcaagag	cacctctggg	420
ggcacagcgg	ccctgggctg	cctggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggt	gacggtgtcg	480
tggaactcag	gcgccctgac	cagcggcgtg	cacaccttcc	cggctgtcct	acagtcctca	540
ggactctact	ccctcagcag	cgtggtgacc	gtgccctcca	gcagcttggg	caccagacc	600
tacatctgca	acgtgaatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagag	agttggtgag	660
aggccagcac	agggagggag	ggtgtctgct	ggaagccagg	ctcagcgctc	ctgcctggac	720
gcatcccggc	tatgcagtcc	cagtccaggg	cagcaaggca	ggccccgtct	gcctcttcac	780
ccggaggcct	ctgcccggcc	cactcatgct	cagggagagg	gtcttctggc	tttttcccca	840
ggctctgggc	aggcacaggc	taggtgcccc	taaccaggc	cctgcacaca	aaggggcagg	900
tgctgggctc	agacctgcca	agagccatat	ccgggaggac	cctgcccctg	acctaagccc	960
accccaaagg	ccaaactctc	cactccctca	gctcggacac	cttctctcct	cccagattcc	1020
agtaactccc	aatcttctct	ctgcagagcc	caaatcttgt	gacaaaactc	acacatgccc	1080

ES 2 633 817 T3

accgtgcccc ggtaagccag cccaggcctc gccctccagc tcaaggcggg acaggtgccc 1140
tagagtagcc tgcattccag gacaggcccc agccgggtgc tgacacgtcc acctccatct 1200
cttctcagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtcctt cctcttcccc ccaaaaacca 1260
aggacaccct catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc 1320
acgaagacc ttaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca 1380
agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg 1440
tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc 1500
tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg tgggaccctg ggggtgagag 1560
ggccacatgg acagaggccg gctcggccca ccctctgccc tgagagtgac cgctgtacca 1620
acctctgtcc ctacagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1680
gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1740
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1800
cccgtgctgg actccgacgg ctccctcttc ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc 1860
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1920
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa 1956

<210> 21

<211> 657

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 21

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgaccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtccagtca gagcctcctg tatagtaatg gatacaacta tttggattgg 120
tacctgcaga agccagggca gtctccacag gtcctgatct ctttgggttc taatcgggcc 180
tccgggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgca tgcaagctcg acaaactcca 300
ttcactttcg gccctgggac caaagtggat atcagacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgctg 420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
agcagcacc tgcagctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600
gtcaccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

ES 2 633 817 T3

<210> 22
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5 <400> 22

```

caggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga gtggtgcagc ctggccggtc cctgagactg      60
tcttgcgccc cctccggctt caccttctcc agctacggca tgcactgggt gcgacaggcc      120
cctggcaagg gactggaatg ggtggccgtg atctcctacg aggaatccaa cagataccac      180
gctgactccg tgaagggccg gttcacaatc tcccgggaca actccaagat caccctgtac      240
ctgcagatga actccctgcg gaccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggacgga      300
ggaatcgccc ctctggacc tgattattgg ggccagggca ccctggtgac agtgtcctcc      360
gctagcacca agggcccctc cgtgttcctt ctggccccct ccagcaagtc cacctctggc      420
ggcaccgccc ctctgggctg cctggtgaaa gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc      480
tggaaactctg gcgccctgac ctccggcgtg cacacctttc cagccgtgct gcagtcctcc      540
ggcctgtact ccctgtcctc cgtggtgacc gtgccctcta gctctctggg caccagacc      600
tacatctgca acgtgaacca caagccctcc aacaccaagg tggacaagcg ggtggaacct      660
aagtcctgcg acaagaccca cacctgtccc ccctgccctg ccctgaact gctgggcgga      720
ccttccgtgt tctgttccc cccaaagccc aaggacacct tgatgatctc ccggaccccc      780
gaagtgacct gcgtgggtgt ggacgtgtcc cacgaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg      840
tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga acagtacgcc      900
tccacctacc ggggtggtgtc tgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa      960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaggcc ctgcctgccc ccatcgaaaa gaccatctcc     1020
aaggccaagg gccagccccg cgagccacag gtgtacacac tgccccccag ccgggaagag     1080
atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctgggtcaaag gcttctacct ctccgatatc     1140
gccgtggagt gggagtccaa cggacagccc gagaacaact acaagaccac cccccctgtg     1200
ctggactccg acggctcatt cttcctgtac tccaagctga ccgtggacia gtcccgggtg     1260
cagcagggca acgtgttctc ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacia ccactacacc     1320
cagaagtccc tgtccctgag ccccggaag                                     1350
    
```

<210> 23
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10

ES 2 633 817 T3

<400> 23

gacatcgtga tgacccagtc ccccctgtcc ctgaccgtga cacctggcga gcctgcctct	60
atctcctgca gatcctccca gtcctctgtg tactccaacg gctacaacta cctggactgg	120
tatctgcaga agcccggcca gtccccacag gtgctgatct ccctgggctc caacagagcc	180
tctggcgtgc ccgaccggtt ctccggctct ggctctggca ccgacttcac actgaagatc	240
tcacgggtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgca tgcaggcccg gcagaccccc	300
ttcaccttcg gccctggcac caaggtggac atccggcgta cggtagccgc tcccagcgtg	360
ttcatcttcc cccccagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgcctg	420
ctgaacaact tctacccccg ggaggccaag gtgcagtgga aggtggaaa cgccctgcag	480
agcggcaaca gccaggagag cgtcacccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg	540
agcagcacc ccgaccctgag caaggccgac tacgagaagc ataaggtgta cgccctgcgag	600
gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc	657

<210> 24

<211> 1350

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 24

ES 2 633 817 T3

caggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga gtggtgcagc ctggccggtc cctgagactg 60
 tcttgcgccg cctccggctt caccttctcc agctacggca tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggcaagg gactggaatg ggtggccgtg atctcctacg aggaatccaa cagataccac 180
 gctgactccg tgaagggccg gttcacaatc tcccgggaca actccaagat caccctgtac 240
 ctgcagatga actccctgcg gaccgaggac accgccgtgt actactgcmc cagggacgga 300
 ggaatcgccg ctctggacc tgattattgg ggccagggca ccctgggtgac agtgtcctcc 360
 gctagcacca agggcccctc cgtgttccct ctggccccct ccagcaagtc cacctctggc 420
 ggcaccgccg ctctgggctg cctggtgaaa gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
 tggaaactctg ggcacctgac ctccggcgtg cacaccttcc cagccgtgct gcagtcctcc 540
 ggctgtact ccctgtcctc cgtgggtgacc gtgccctcta gctctctggg caccagacc 600
 tacatctgca acgtgaacca caagccctcc aacaccaagg tggacaagcg ggtggaaccc 660
 aagtctgcm acaagacca cacctgtccc ccctgccctg cccctgaact gctgggcgga 720
 ccttccgtgt tccctgtccc cccaaagccc aaggacaccc tgatgatctc ccggaccccc 780
 gaagtgcact gcgtgggtgt ggccgtgtcc cacgaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg 840
 tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga acagtacaac 900
 tccacctacc ggggtggtgtc tgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa 960
 gagtacaagt gcaaggctc caacaaggcc ctgcctgcc ccacgaaaa gaccatctcc 1020
 aaggccaagg gccagccccg cgagccacag gtgtacacac tgccccccag ccgggaagag 1080
 atgaccaaga accagggtgtc cctgacctgt ctgggtcaaag gcttctaccc ctccgatatc 1140
 gccgtggagt gggagtccaa cggacagccc gagaacaact acaagaccac cccccctgtg 1200
 ctggactccg acggtcatt cttcctgtac tccaagctga ccgtggacaa gtccccgtgg 1260

 cagcagggca acgtgttctc ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320
 cagaagtccc tgtccctgag ccccggcaag 1350

<210> 25

<211> 657

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 25

ES 2 633 817 T3

gacatcgtga tgacccagtc cccctgtcc ctgaccgtga cacctggcga gcctgcctct 60
atctcctgca gatcctccca gtccctgctg tactccaacg gctacaacta cctggactgg 120
tatctgcaga agcccggcca gtccccacag gtgctgatct ccctgggctc caacagagcc 180
tctggcgtgc ccgaccggtt ctccggctct ggctctggca ccgacttcac actgaagatc 240
tcacgggtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgca tgcaggcccg gcagaccccc 300
ttcaccttog gccctggcac caaggtggac atccggcgta cggtagccgc tcccagcgtg 360
ttcatcttcc ccccagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgcctg 420
ctgaacaact tctacccccg ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacia cgcctgcag 480
agcggcaaca gccaggagag cgtcacccag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
agcagcacc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc ataaggtgta cgcctgcgag 600
gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc 657

<210> 26

<211> 1350

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 26

caggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga gtggtgcagc ctggccggtc cctgagactg 60
tcttgcccg cctccggctt caccttctcc agctacggca tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggcaagg gactggaatg ggtggccgtg atctcctacg aggaatccaa cagataccac 180
gctgactccg tgaagggccg gttcacaatc tcccgggaca actccaagat caccctgtac 240
ctgcagatga actccctgcg gaccgaggac accgccgtgt actactgccc cagggacgga 300
ggaatcgccg ctctggacc tgattattgg ggcagggca ccctggtgac agtgtcctcc 360
gctagcacca agggcccctc cgtgttcctt ctggcccctt ccagcaagtc tacctccggc 420
ggcacagctg ctctgggctg cctggcgaag gactacttcc ctgagcctgt gacagtgtcc 480
tggaactctg gcgccctgac ctctggcgtg cacaccttcc ctgccgtgct gcagtccctc 540
ggcctgtact ccctgtcctc cgtggtcaca gtgccttcaa gcagcctggg caccagacc 600
tatactgca acgtgaacca caagccttcc aacaccaagg tggacaagcg ggtggagcct 660

ES 2 633 817 T3

aagtcctgcg acaagaccca cacctgtcct ccctgccctg ctctgaagc tgctggcggc 720
 ccttctgtgt tcctgttccc tccaaagccc aaggacaccc tgatgatctc cgggaccct 780
 gaagtgacct gcgtgggtgt ggacgtgtcc cagcaggatc ctgaagtga gttcaattgg 840
 tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ctcgaggagga acagtacaac 900
 tccacctacc ggggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa 960
 gagtacaagt gcaaagtctc caacaaggcc ctgcctgccc ctatcgaaaa gacaatctcc 1020
 aaggccaagg gccagcctag ggaaccccag gtgtacaccc tgccaccag cggggaggaa 1080
 atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtcaagg gcttctaccc ttccgatatc 1140
 gccgtggagt gggagtctaa cggccagcct gagaacaact acaagaccac ccctcctgtg 1200
 ctggactcog acggctcctt cttcctgtac tccaaactga ccgtggacia gtcccgggtg 1260
 cagcagggca acgtgttctc ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacia ccactacacc 1320
 cagaagtccc tgtccctgtc tcccggcaag 1350

<210> 27

<211> 657

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 27

gacatcgtga tgaccagtc cccctgtcc ctgaccgtga cacctggcga gcctgcctct 60
 atctcctgca gatcctcca gtccctgctg tactccaacg gctacaacta cctggactgg 120
 tatctgcaga agcccggcca gtcccacag gtgctgatct ccctgggctc caacagagcc 180
 tctggcgtgc ccgaccggtt ctccggctct ggctctggca ccgacttcac actgaagatc 240
 tcacgggtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgca tgcaggcccg gcagaccccc 300
 ttcaccttcg gccctggcac caaggtggac atccggcgta cgggtggccg tcccagcgtg 360
 ttcattctcc cccccagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgcctg 420
 ctgaacaact totacccccg ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacia cgccctgcag 480
 agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
 agcagcacc ccgacctgag caaggccgac tacgagaagc ataaggtgta cgcctgcgag 600
 gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc 657

<210> 28

<211> 277

10 <212> PRT

ES 2 633 817 T3

<213> Homo sapiens

<400> 28

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

ES 2 633 817 T3

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

ES 2 633 817 T3

260

265

270

Val Gln Glu Arg Gln
275

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado dirigido contra un polipéptido CD40 objetivo (SEQ ID NO: 28), caracterizado porque dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 11 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 12.
- 5 2. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo inhibe la señalización inducida por CD40L con una IC50 de 50 ng/ml o menos.
3. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho anticuerpo no tiene ninguna actividad agonista, o tiene una baja actividad agonista con respecto a la señalización de CD40.
4. El anticuerpo aislado acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para uso como un medicamento.
- 10 5. El anticuerpo aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para uso en el tratamiento de trastornos autoinmunes y/o trastornos inflamatorios.
6. El anticuerpo aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para uso en la prevención o reducción del riesgo de rechazo de injerto en el trasplante.
- 15 7. El anticuerpo aislado para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el uso es el tratamiento de esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, nefritis por lupus, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide, y la enfermedad del injerto contra el huésped.
8. Una composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en combinación con al menos un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, que comprende adicionalmente otros ingredientes activos.
10. Una formulación farmacéutica líquida que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, con al menos un regulador.
11. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 25 12. Un vector de clonación o de expresión, que comprende uno o más ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 11.
13. Un vector de clonación o de expresión de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende las secuencias de codificación SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23 operativamente enlazadas a las secuencias promotoras adecuadas:
14. Una célula huésped, que comprende uno o más vectores de clonación o de expresión de acuerdo con las reivindicaciones 12 a 13.
- 30 15. Un proceso para la producción de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 14, purificar y recuperar dicho anticuerpo.

Figura 1

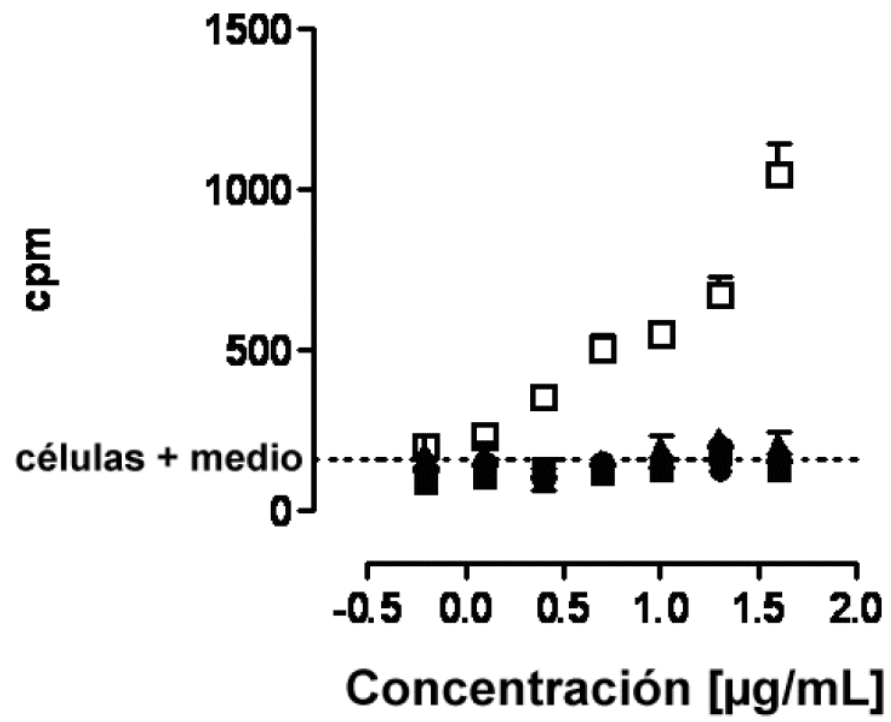


Figura 2

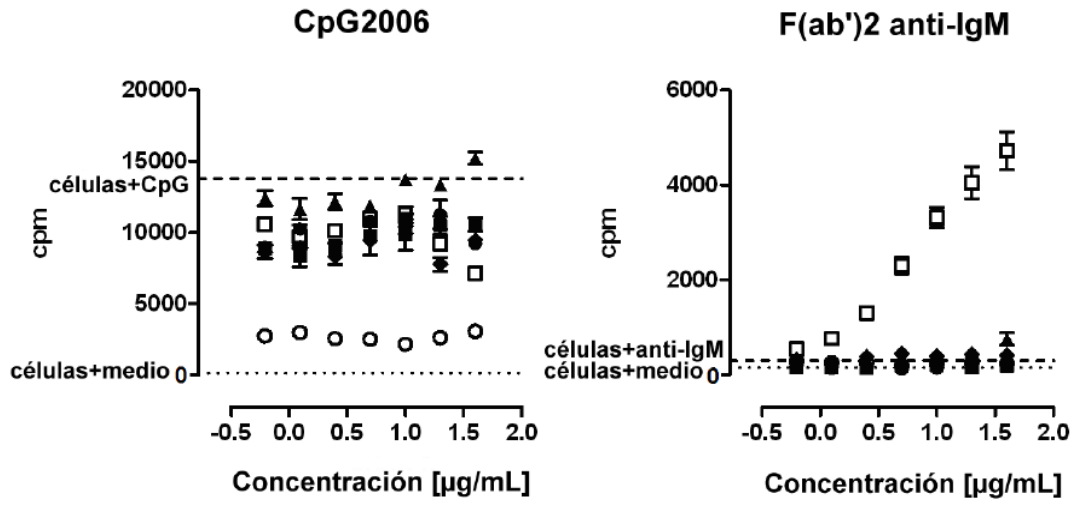


Figura 3

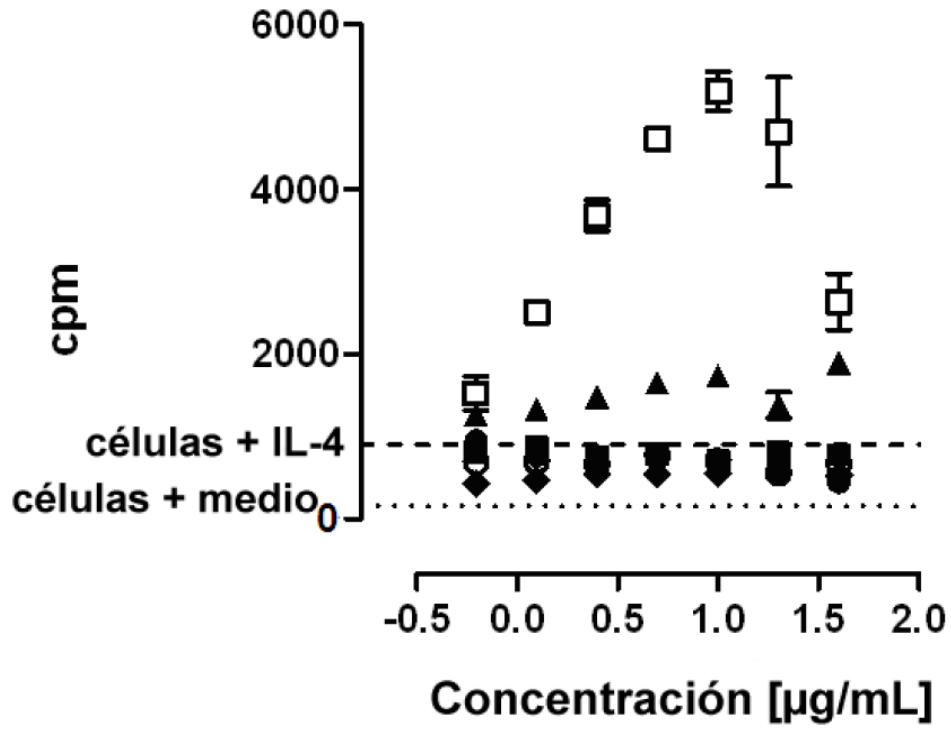


Figura 4

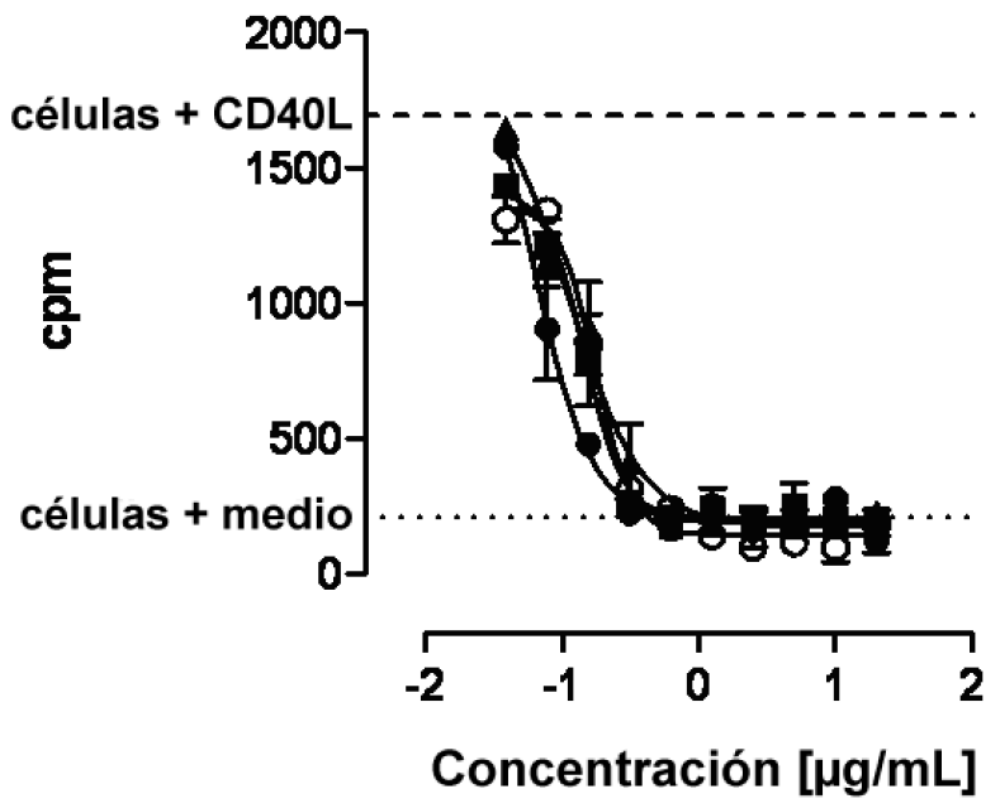


Figura 5

