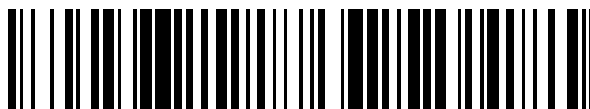


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 654**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2012** **PCT/US2012/035502**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2012** **WO12149356**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2012** **E 12777376 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018** **EP 2702078**

54 Título: **Anticuerpos anti-CD40 y métodos de uso**

30 Prioridad:

29.04.2011 US 201161480863 P
10.04.2012 US 201261622435 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
17.04.2019

73 Titular/es:

APEXIGEN, INC. (100.0%)
75 Shoreway Road, Suite C
San Carlos, CA 94070, US

72 Inventor/es:

ZHANG, YONGKE;
YU, GUO-LIANG y
ZHU, WEIMIN

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 709 654 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-CD40 y métodos de uso

Antecedentes

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere generalmente a anticuerpos anti-CD40, a composiciones y a métodos de uso de los mismos. Tales anticuerpos son útiles, por ejemplo, para su uso en un método de tratamiento de una variedad de enfermedades oncológicas.

Descripción de la técnica relacionada

- 10 La mayoría de leucemias y linfomas se originan a partir de la transformación maligna de células del linaje B. La expresión de antígenos restringidos al linaje B de superficie celular tales como CD20 la convierte en una diana atractiva para la terapia con anticuerpos. Los agentes terapéuticos de anticuerpos han cambiado drásticamente el manejo de pacientes con linfoma no Hodgkin (LNH) y leucemia linfocítica crónica (LLC). Desde la aprobación de rituximab, el anticuerpo solo o en combinación con quimioterapia ha mejorado notablemente las tasas de respuesta, los desenlaces a largo plazo y la calidad de vida (Chinn P, Braslawsky G, White C, *et al.* Therapie of non-Hodgkin's B-cell lymphoma. Cancer Immunol Immunother 2003; 52:257-280; Rastetter W, Molina A, White CA. Rituximab: Expanding role in therapie for lymphomas and autoimmune diseases. Annu Rev Med 2004; 55:477-503). Sin embargo, un número sustancial de pacientes presentan o bien resistencia primaria o bien adquirida a rituximab, lo que sugiere que los enfoques actuales que seleccionan como diana CD20 tienen limitaciones en los desenlaces clínicos, y existe la necesidad de mejora desarrollando agentes inmunoterapéuticos novedosos para linfoma y leucemia de células B con distintos mecanismos de acción (Stolz C, Schuler M. Molecular mechanisms of resistance to Rituximab and pharmacologic strategies for its circumvención. Leukemia and lymphoma. 2009; 50(6):873 - 885; Bello C, Sotomayor EM. Monoclonal antibodies for B-cell lymphomas: Rituximab and beyond. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2007; 233-242; Dupire S, Coiffier B. Targeted treatment and new agents in diffuse large B cell lymphoma. Int J Hematol 2010; 18 de junio (en línea)), tal como el AcM anti-CD40, APX005.

- 25 El papel de CD40 en la regulación de respuestas inmunitarias

- La activación completa de células T requiere dos señales distintas pero sinérgicas. La primera señal, enviada a través del receptor de antígeno de células B, la proporciona un complejo de antígeno y CMH en las APC y es responsable de la especificidad de la respuesta inmunitaria. La señal secundaria, o coestimuladora es a través de la interacción de CD28 con B7-1 (CD80)/B7-2 (CD86), y CD40 con CD40L, que se requieren para montar una respuesta de células T a escala completa. En ausencia de señales coestimuladoras, las células T pueden experimentar falta de respuesta (anergia) o muerte celular programada (apoptosis) tras la estimulación con antígeno.

- 30 CD40, un miembro de la superfamilia de receptores de TNF (TNFR), se expresa principalmente en células B y otras células presentadoras de antígeno (APC) tales como células dendríticas y macrófagos. El ligando de CD40 (CD40L) lo expresan principalmente células T activadas.

- 35 La interacción de CD40 y CD40L sirve como señal coestimuladora para la activación de células T. El acoplamiento de CD40-CD40L en células B en reposo induce proliferación, cambio de clase de inmunoglobulinas, secreción de anticuerpos, y también tiene un papel en el desarrollo de centros germinales y la supervivencia de células B de memoria, todo lo cual es esencial para respuestas inmunitarias humores (Kehry MR. J Immunol 1996; 156: 2345-2348). La unión de CD40L a CD40 en células dendríticas induce maduración de DC tal como se manifiesta aumentando la expresión de moléculas coestimuladoras tales como la familia B7 (CD80, CD86) y la producción de citocinas proinflamatorias tales como interleucina 12. Esto conduce a potentes respuestas de células T (Stout, R. D., J. Suttles. 1996. Immunol. Today 17:487-492; Brendan O'Sullivan, Ranjeny Thomas. Critical Reviews in Immunology 2003; 23: 83-107; Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia, G. Alber. J. Exp. Med. 1996; 184:747-452).

- 45 La transducción de señales de CD40 activa múltiples rutas que incluyen NF-KappaB (factor nuclear KappaB), MAPK (proteína cinasa activada por mitógeno) y STAT3 (transductores de señales y activadores de la transcripción 3) (Pype S, *et al.* J Biol Chem. 16 de junio de 2000; 275(24):18586-93) que regulan la expresión génica a través de la activación de proteínas activadoras, c-Jun, ATF2 (factor de transcripción activador 2) y factores de transcripción Rel (Dadgostar H, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA. 5 de febrero de 2002; 99(3):1497-502). Las proteínas adaptadoras del factor asociado al receptor TNFR (por ejemplo, TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF5 y TRAF6) interaccionan con este receptor y sirven como mediadoras de la transducción de señales. Dependiendo del tipo de célula particular, el acoplamiento de CD40 da como resultado un patrón de expresión génica particular. Los genes activados en respuesta a la señalización de CD40 incluyen un gran número de citocinas y quimiocinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF-alfa y proteína 1 alfa inflamatoria de macrófagos (MIP1alfa). En determinados tipos de célula, la activación de CD40 puede dar como resultado la producción de radicales citotóxicos (Dadgostar *et al.*, citado anteriormente), COX2 (ciclooxigenasa-2) y producción de NO (óxido nítrico).

El papel de CD40 en tumores

CD40 no sólo lo expresan células inmunitarias normales sino también muchas células malignas. En particular, CD40 se sobreexpresa en LNH de linaje B, leucemias linfocíticas crónicas (CLL), tricoleucemias (HCL), enfermedad de Hodgkin (Uckun FM, Gajl-Peczalska K, Myers DE, *et al.* Blood 1990; 76:2449-2456; O'Grady JT, Stewart S, Lowrey J, *et al.* Am J Pathol 1994; 144: 21-26), mieloma múltiple (Pellat-Deceunynck C, Bataille R, Robillard N, Harousseau JL, Rapp MJ, Juge-Morineau N, Wijdenes J, Amiot M. Blood. 1994; 84(8):2597-603), así como en carcinomas de la vejiga, del riñón, del ovario, del cuello uterino, de la mama, del pulmón, de la nasofaringe y melanoma maligno (Young LS, Eliopoulos AG, Gallagher NJ, *et al.* Immunol Today 1998; 19:502-6; Ziebold JL, Hixon J, Boyd A, *et al.* Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2000; 48: 225-33; Gladue R, Cole S, Donovan C, *et al.* J Clin Oncol 2006; 24 (18S):103s).

La ligación de CD40 sobre la superficie de células tumorales, que en muchos casos, media en un efecto citotóxico directo, da como resultado la regresión tumoral a través de apoptosis y necrosis (Grewal IS, Flavell RA. Annu Rev Immunol 1998; 16:111-35; van Kooten C, Banchereau J. J Leukoc Biol 2000; 67(1):2-17). Aunque las funciones exactas de CD40 en células tumorales no están claras (Tong AW, Stone MJ. Cancer Gene Ther. 2003 10(1):1-13), el acoplamiento de CD40 *in vitro* inhibe el crecimiento de células de tumores sólidos y células de linfoma de células B de alto grado (Magi Khalil y Robert H. Vonderheide. Update Cancer Ther 2007; 2(2): 61-65; Young LS, Eliopoulos AG, Gallagher NJ, Dawson CW. Immunol Today 1998; 19(11):502-6; Funakoshi S, Longo DL, Beckwith M, *et al.* Blood 1994; 83(10):2787-94; Hess S, Engelmann H. J Exp Med 1996; 183(1):159-67; Eliopoulos AG, Dawson CW, Mosialos G, *et al.* Oncogene 1996; 13(10):2243-54; von Leoprechting A, van der Bruggen P, Pahl HL, Aruffo A, Simon JC. Cancer Res 1999; 59(6):1287-94). Estos efectos contrastan con la proliferación inducida tras el acoplamiento de CD40 en células dendríticas y células B no neoplásicas.

Además para dirigir la inhibición tumoral, la activación de la señalización de CD40 rescata la función de células presentadoras de antígeno en huéspedes que llevan tumores y desencadena o restaura respuestas inmunitarias activas contra antígenos asociados a tumores. Se han notificado agonistas de CD40 que vencen la tolerancia de células T en ratones que llevan tumores, provocan respuestas de células T citotóxicas eficaces contra antígenos asociados a tumores y potencian la eficacia de vacunas antitumorales (Eliopoulos AG, Davies C, Knox PG, *et al.* Mol Cell Biol 2000; 20(15): 5503-15; Tong AW, Papayoti MH, Netto G, *et al.* Clin Cancer Res 2001; 7(3):691-703).

CD40 como diana molecular

CD40 se sobreexpresa en una amplia gama de células malignas. Los papeles de CD40 en la inhibición tumoral y la estimulación del sistema inmunitario hacen que CD40 sea una diana atractiva para una inmunoterapia basada en anticuerpos (van Mierlo GJ, den Boer AT, Medema JP, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99(8): 5561-5566; French RR, Chan HT, Tutt AL, Glennie MJ. Nat Med. 1999; 5(5):548-553). Los anticuerpos anti-CD40 pueden actuar contra células cancerosas mediante múltiples mecanismos: (i) función efectora de anticuerpos tal como CCDA, (ii) un efecto citotóxico directo sobre las células tumorales y (iii) activación de respuestas inmunitarias antitumorales.

Anticuerpos terapéuticos anti-CD40 en desarrollo

Se han notificado varios anticuerpos anti-CD40 que tienen potencial como agentes terapéuticos antitumorales. CP-870.893 es un anticuerpo agonista de CD40 de IgG₂ humano completo desarrollado por Pfizer. Se une a CD40 con una K_D de 3,48 x 10⁻¹⁰ M, pero no bloquea la unión de CD40L (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 7.338.660). CP-870893 ha mostrado efectos de CCDA; posiblemente debido a su isotipo de IgG2. Por tanto, este anticuerpo actúa como agonista de CD40 (es decir, no afecta a la unión de CD40L), induce señalización proapoptótica y activa las DC y vigilancia inmunitaria. Sin embargo, este anticuerpo no media en la CCDA.

HCD122 es un anticuerpo antagonista de CD40 de IgG1 humano completo desarrollado por Novartis. Se une a CD40 con una K_D de 5,1 x 10⁻¹⁰ M, bloquea la unión de CD40 a CD40L, inhibe la señalización inducida por el ligando de CD40 y los efectos biológicos sobre células B y determinadas células de LLC y MM primarias (Tai YT, *et al.* Cancer Res. 1 de julio de 2005; 65(13):5898-906; Luqman M, Klabunde S, *et al.* Blood 112:711-720, 2008). El mecanismo de acción principal para su efecto antitumoral *in vivo* es la CCDA (Long L, *et al.* 2005 IMF presentación oral y resumen n.º. 3; Blood 2004, 104(11, parte 1): Abst 3281). Debido a sus características antagonistas, este anticuerpo no puede inducir directamente una respuesta inmunitaria antitumoral mediada por CD40.

El documento WO 2006/128103 da a conocer SGN-40, un anticuerpo de IgG1 humanizado desarrollado por Seattle Genetics a partir del clon de anticuerpo de ratón S2C6, que se generó usando una línea celular de carcinoma de vejiga humano como inmunógeno. Se une a CD40 con una K_D de 1,0 x 10⁻⁹ M y funciona a través de la potenciación de la interacción entre CD40 y CD40L, presentando por tanto un efecto agonista parcial (Francisco JA, *et al.*, Cancer Res, 60: 3225-31, 2000). SGN-40 envía señales inhibitorias de la proliferación y de apoptosis a un panel de líneas de linfoma B originadas a partir de células de MM y de linfoma no Hodgkin de alto grado (Tai YT, Catley LP, Mitsiades CS, *et al.* Cancer Res 2004; 64(8):2846-2852). Los estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que tanto la señalización apoptótica como la función efectora de anticuerpos a través de CCDA contribuyen a la actividad antitumoral de SGN-40 (Law CL, Gordon KA, Collier J, *et al.* Cancer Res 2005; 65:8331-8338). Un estudio reciente sugirió que la actividad antitumoral de SGN-40 depende significativamente de interacciones de Fc con las células

efectoras y que los macrófagos son los principales efectores que contribuyen a sus actividades terapéuticas (Oflazoglu E, *et al.* Br J Cáncer. 13 de enero de 2009; 100(1):113-7. Pub. elec. 9 de diciembre de 2008). Ya que SGN-40 es un agonista parcial y requiere que CD40L se exprese en células T, SGN-40 también puede tener una capacidad limitada para reforzar de manera completa la respuesta inmunitaria antitumoral.

- 5 Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad en la técnica de agentes inmunoterapéuticos novedosos que seleccionen como diana CD40 y que actúen como agonista para esta diana, activen células dendríticas y la vigilancia inmunitaria y que activen la CCDA, proporcionando de ese modo propiedades anticancerígenas mejoradas.

Sumario breve

- 10 Un aspecto de la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a CD40 humano y es un agonista de CD40, que comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende la región VHCDR1 expuesta en SEQ ID NO:3, la región VHCDR2 expuesta en SEQ ID NO:4 y la región VHCDR3 expuesta en SEQ ID NO:5; y (ii) una región variable de cadena ligera que comprende la región VLCDR1 expuesta en SEQ ID NO:6, la región VLCDR2 expuesta en SEQ ID NO:7 y la región VLCDR3 expuesta en SEQ ID NO:8. En una realización de los anticuerpos dados a conocer en el presente documento, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:1. En una realización adicional, la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:2.

- En determinadas realizaciones, los anticuerpos aislados tal como se dan a conocer en el presente documento están humanizados. Se exponen regiones variables de anticuerpos humanizados ilustrativas en la secuencia de aminoácidos de la región VH de SEQ ID NO:9 y la secuencia de aminoácidos de la región VL de SEQ ID NO:10.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos en el presente documento son anticuerpo completos.

En otra realización, los anticuerpos aislados tal como se describen en el presente documento comprenden un dominio constante de IgG humana, tal como, pero sin limitarse a un dominio CH1 de IgG1 o una región Fc de IgG1.

- En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se describe en el presente documento, en el que el anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo: estimula la liberación de citocinas a partir de células presentadoras de antígeno; induce la apoptosis de células tumorales; inhibe la proliferación de células tumorales; destruye células tumorales a través de la inducción de funciones efectoras seleccionadas del grupo que consiste en citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, citotoxicidad dependiente de complemento y fagocitosis celular dependiente de anticuerpos; estimula respuestas de células T antitumorales; reduce tumores establecidos; inhibe tumores resistentes a rituximab; o una combinación de una cualquiera o más de las mencionadas anteriormente.

- La presente divulgación también proporciona polinucleótidos aislados que codifican para los anticuerpos aislados, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos tal como se da a conocer en el presente documento, un vector de expresión que comprende los nucleótidos aislados y/o una célula huésped aislada que comprende el vector que comprende los nucleótidos aislados.

La presente divulgación también proporciona composiciones que comprenden un portador fisiológicamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se describe en el presente documento.

- Otro aspecto de la presente divulgación proporciona una composición que comprende un portador fisiológicamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se describe en el presente documento para su uso en un método para el tratamiento de un paciente que tiene un cáncer, que comprende administrar al paciente una composición que comprende un portador fisiológicamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se describe en el presente documento, tratando o mejorando de ese modo el cáncer, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en linfomas no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemias linfocíticas crónicas, tricoleucemias, leucemias linfoblásticas agudas, mieloma múltiple, carcinomas del páncreas, del colon, gástricos, del intestino, de la próstata, de la vejiga, del riñón, del ovario, del cuello uterino, de la mama, del pulmón, de la nasofaringe, melanoma maligno y leucemias y LNH resistentes a rituximab.

- Otro aspecto de la presente divulgación proporciona una composición que comprende un portador fisiológicamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se describe en el presente documento para su uso en un método de mejora de los síntomas en un paciente que tiene enfermedad autoinmunitaria y/o enfermedad inflamatoria, que comprende administrar al paciente una composición que comprende un portador fisiológicamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se describe en el presente documento, mejorando de ese modo los síntomas en el paciente que tiene enfermedades autoinmunitarias y/o inflamatorias.

Breve descripción de las secuencias

SEQ ID NO:1 es la secuencia de aminoácidos de la región VH del anticuerpo anti-CD40 de conejo R-8.

SEQ ID NO:2 es la secuencia de aminoácidos de la región VL del anticuerpo anti-CD40 de conejo R-8.

SEQ ID NO:3 es la secuencia de aminoácidos de la región VHCDR1 del anticuerpo anti-CD40 de conejo R-8.

5 SEQ ID NO:4 es la secuencia de aminoácidos de la región VHCDR2 del anticuerpo anti-CD40 de conejo R-8.

SEQ ID NO:5 es la secuencia de aminoácidos de la región VHCDR3 del anticuerpo anti-CD40 de conejo R-8.

SEQ ID NO:6 es la secuencia de aminoácidos de la región VLCDR1 del anticuerpo anti-CD40 de conejo R-8.

SEQ ID NO:7 es la secuencia de aminoácidos de la región VLCDR2 del anticuerpo anti-CD40 de conejo R-8.

SEQ ID NO:8 es la secuencia de aminoácidos de la región VLCDR3 del anticuerpo anti-CD40 de conejo R-8.

10 SEQ ID NO:9 es la secuencia de aminoácidos de la región VH de APX005, la versión humanizada del anticuerpo anti-CD40 de conejo R-8, sin un péptido señal.

SEQ ID NO:10 es la secuencia de aminoácidos de la región VL de APX005, la versión humanizada del anticuerpo anti-CD40 de conejo R-8, sin un péptido señal.

15 SEQ ID NO:11-21 y 33-44 son secuencias de aminoácidos de cadena pesada de candidatos a anticuerpo anti-CD40 de conejo que mostraban actividad funcional (véase la figura 16).

SEQ ID NO:22-32 y 45-56 son secuencias de aminoácidos de cadena ligera de candidatos a anticuerpo anti-CD40 de conejo que mostraban actividad funcional (véase la figura 16).

SEQ ID No:57-79 son las secuencias de aminoácidos de VHCDR1 para los anticuerpos anti-CD40 mostrados en la figura 16.

20 SEQ ID No:80-102 son las secuencias de aminoácidos de VHCDR2 para los anticuerpos anti-CD40 mostrados en la figura 16.

SEQ ID No:103-125 son las secuencias de aminoácidos de VHCDR3 para los anticuerpos anti-CD40 mostrados en la figura 16.

25 SEQ ID No:126-148 son las secuencias de aminoácidos de VLCDR1 para los anticuerpos anti-CD40 mostrados en la figura 16.

SEQ ID No:149-171 son las secuencias de aminoácidos de VLCDR2 para los anticuerpos anti-CD40 mostrados en la figura 16.

SEQ ID No:172-194 son las secuencias de aminoácidos de VLCDR3 para los anticuerpos anti-CD40 mostrados en la figura 16.

30 Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-1D muestran los resultados del examen de anticuerpos agonistas midiendo la maduración de DC y la activación de células T tal como se describe en el ejemplo 1. 1A: expresión de CD83; 1B: expresión de CD80; 1C: expresión de CD86; 1D: proliferación de células T en una reacción de linfocitos mixtos.

35 La figura 2 es un gráfico que muestra la comparación de candidatos principales en la inhibición de proliferación de células Ramos.

La figura 3 es un gráfico de barras que muestra los resultados de un ensayo de CCDA. Efecto (PBMC humana): célula diana (célula Ramos) razón de 40:1.

La figura 4A y figura 4B son gráficos que muestran los resultados del examen *in vivo* de la actividad antitumoral de candidatos anti-CD40.

40 La figura 5 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo ELISA que demuestran que APX005 se une selectivamente a CD40 pero no a otros miembros de la familia de TNFR.

La figura 6 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo ELISA que demuestran que APX005 bloquea la unión de CD40L a CD40.

La figura 7 es un gráfico que muestra que APX005 no se internaliza tras la unión a células positivas para CD40.

La figura 8A y figura 8B son gráficos que muestran que la CCDA mediada por APX005 de células tumorales Ramos (A) y Daudi (B) positivas para CD40.

La figura 9A y figura 9B son gráficos que muestran la inhibición *in vitro* de la proliferación de células tumorales Ramos mediante APX005. Panel A: sin reticulación de Fc; panel B: con reticulación de Fc.

- 5 La figura 10 es un gráfico de barras que muestra la inducción de activación de DC mediante APX005.

Las figuras 11A y 11B muestra que APX005 se une a CD40 humano y de mono pero no a CD40 de ratón.

La figura 12A es un gráfico que muestra la inhibición por APX005 del crecimiento tumoral en un modelo de Ramos. La figura 12B es un gráfico de barras que muestran los niveles de IgG humana sérica en ratones en el día 34, dos días tras la última dosificación.

- 10 Las figuras 13A y 13B son gráficos que muestran la inhibición de tumores resistentes y pretratados con rituximab en un modelo de ratón.

La figura 14 es un gráfico que muestra la inhibición por APX005 del crecimiento tumoral en el modelo de ratón Raji.

La figura 15 es un gráfico que muestra la potente actividad antitumoral de APX005 contra mieloma múltiple humano en el modelo de xenoinjerto de IM-9.

- 15 Las figuras 16A-16L son una alineación de secuencias de anticuerpos de cadena pesada (16A-16F) y de cadena ligera (16G-16L) anti-CD40 de conejo. Las CDR1-3 de cadena ligera y pesada están subrayadas. Las SEQ ID NO son las siguientes: Cadena pesada: R-3 y R-6: SEQ ID NO:11, 12; R-8: SEQ ID NO:1; R-9, -16, -18, -24, -33, -36, 19-21, -45, -59: SEQ ID NO:13-21, respectivamente; R-2, R-5, R-7, R-10, R-12, R-20, R-26, R-30, R-35, 19-35, 19-41, 19-57: SEQ ID No:33-44, respectivamente. Cadena ligera: R-3 y R-6: SEQ ID NO:22 y 23; R-8: SEQ ID NO:2; R-9, -16, -18, -24, -33, -36, 19-21, -45, -59: SEQ ID NO:24-32, respectivamente; R-2, R-5, R-7, R-10, R-12, R-20, R-26, R-30, R-35, 19-35, 19-41, 19-57: SEQ ID No:45-56, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos incluyen el péptido señal de VH y VL. Las secuencias de aminoácidos de VHCDR y VLCDR de R-8 se exponen en SEQ ID No:3-8. Las secuencias de aminoácidos de VHCDR y las secuencias de aminoácidos de VLCDR para los anticuerpos restantes se exponen en SEQ ID No:57-125 y SEQ ID No:126-194, respectivamente.

- 25 Las figuras 17A y 17B muestran la inhibición del crecimiento tumoral en el modelo de Ramos mediante APX005 en comparación con SGN-40 y rituximab.

Las figuras 18A y 18B muestran la inhibición mediante APX005 del crecimiento tumoral en modelo de xenoinjerto de linfoma de Namalwa humano resistente a rituximab.

Descripción detallada

- 30 El alcance de la invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas. La presente divulgación se refiere a anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos se unen específicamente a CD40 en particular anticuerpos que tienen propiedades funcionales y especificidad epitópica específica. Una realización de la invención abarca anticuerpos humanizados específicos y fragmentos de los mismos que pueden unirse a CD40 y funcionar como agonista de CD40 induciendo/potenciando señalización celular aguas abajo mediada por CD40 y efectos biológicos. En realizaciones más específicas de la invención, los anticuerpos descritos en el presente documento se unen específicamente a CD40 con afinidad muy alta, tal como una afinidad de al menos entre 980 y 950 picomolar, al menos entre 970 y 950 picomolar, y en determinadas realizaciones con una afinidad de 960 picomolar. Los anticuerpos descritos en el presente documento, entre otros atributos, inducen señalización de CD40 en células tumorales, activan células dendríticas y vigilancia inmunitaria, activan citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) contra células tumorales, bloquean la unión de CD40 a CD40L; tienen actividad agonista de CD40; activan células presentadoras de antígeno; estimulan la liberación de citocinas a partir células presentadoras de antígeno; induce la apoptosis de células tumorales; inhiben la proliferación de células tumorales; destruyen células tumorales a través de la inducción de funciones efectoras que incluyen, pero no se limitan a, CCDA, CDC y ADCP; estimulan respuestas de células T antitumorales; reducen tumores establecidos; e inhiben tumores resistentes a rituximab. Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden tener o inducir una combinación de uno cualquiera o más de estos atributos o actividades.

- Realizaciones de la invención se refieren al uso de anticuerpos anti-CD40 o fragmento de unión a antígenos de los mismos para el diagnóstico, la evaluación y el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con CD40 o la expresión aberrante del mismo. Los anticuerpos objeto se usan en el tratamiento o la prevención de cánceres que incluyen, pero no se limitan a, linfomas no Hodgkins, linfoma de Hodgkin, leucemias linfocíticas crónicas, tricoleucemias, leucemias linfoblásticas agudas, mieloma múltiple, carcinomas de la vejiga, del riñón, del ovario, del cuello uterino, de la mama, del pulmón, de la nasofaringe, melanoma maligno y leucemias y LNH resistentes a rituximab, enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias entre otras enfermedades.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique específicamente lo contrario, métodos

convencionales de virología, inmunología, microbiología, biología molecular y técnicas de ADN recombinante dentro del conocimiento de la técnica, muchos de los cuales se describen a continuación con el fin de ilustración. Tales técnicas se explican de manera completa en la bibliografía. Véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* o *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y. (2009); Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology*, 3ª ed., Wiley & Sons, 1995; Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ª edición, 2001); Maniatis *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984) y otras referencias similares.

- 5 Tal como se usan en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un,” “una” y “el/la” incluyen las referencias en plural a menos que el contenido dicte claramente lo contrario.

A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos el contexto requiera lo contrario, la palabra “comprender”, o variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, se entenderá que implican la inclusión de un elemento establecido o número entero o grupo de elementos o números enteros pero no la exclusión de cualquier otro elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

- 10 Cada realización en esta memoria descriptiva ha de aplicarse cambiando lo que se deba cambiar a todas las otras realizaciones a menos que se declare expresamente lo contrario.

Pueden usarse técnicas convencionales para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y transformación y cultivo de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Pueden realizarse reacciones enzimáticas y técnicas de purificación según las especificaciones del fabricante o como se consigue normalmente en la técnica o tal como se describe en el presente documento. Estos procedimientos y técnicas y relacionados pueden realizarse generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y tal como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se comentan a lo largo de la presente memoria descriptiva. A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y las técnicas y procedimientos de laboratorio de, biología molecular, química analítica, química orgánica de síntesis y química farmacéutica y médica descritos en el presente documento son aquellos bien conocidos y normalmente usados en la técnica. Pueden usarse técnicas convencionales para tecnología recombinante, biología molecular, microbiología, síntesis química, análisis químicos, preparación, formulación y administración farmacéuticas y tratamiento de pacientes.

- 20 Las realizaciones de la presente invención se refieren a anticuerpos que se unen a CD40. En particular, los anticuerpos descritos en el presente documento se unen específicamente a CD40 con una afinidad inesperadamente alta, potencian la actividad de señalización de CD40, activan el sistema inmunitario, activan la CCDA y tienen utilidad terapéutica para el tratamiento de enfermedades asociadas con expresión de CD40 aberrante.

- 25 Se exponen secuencias de anticuerpos ilustrativos, o fragmentos de unión a antígeno, o regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los mismos, en SEQ ID NO:1-194.

Tal como se conoce bien en la técnica, un anticuerpo es una molécula de inmunoglobulina que puede unirse de manera específica a una diana, tal como un hidrato de carbono, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de epítipo, situado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Tal como se usa en el presente documento, el término abarca no sólo anticuerpos monoclonales o policlonales intactos sino, también fragmentos de los mismos (tales como dAb, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), cadena sencilla (ScFv), variantes sintéticas de los mismos, variantes que se producen de manera natural, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo con un fragmento de unión a antígeno de la especificidad requerida, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un fragmento o sitio de unión a antígeno (sitio de reconocimiento de epítipo) de la especificidad requerida. Los “diacuerpos”, fragmentos multivalentes o multispecíficos contruidos mediante fusión génica (documento WO94/13804; P. Holliger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, 1993) son también una forma particular de anticuerpo contemplado en el presente documento. Los minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 también se incluyen en el presente documento (S. Hu *et al.*, Cancer Res., 56, 3055-3061, 1996). Véanse por ejemplo, Ward, E. S. *et al.*, Nature 341, 544-546 (1989); Bird *et al.*, Science, 242, 423-426, 1988; Huston *et al.*, PNAS EE.UU., 85, 5879-5883, 1988); documento PCT/US92/09965; documento WO94/13804; P. Holliger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, 1993; Y. Reiter *et al.*, Nature Biotech, 14, 1239-1245, 1996; S. Hu *et al.*, Cancer Res., 56, 3055-3061, 1996.

- 40 El término “fragmento de unión a antígeno” tal como se usa en el presente documento se refiere a un fragmento de polipéptido que contiene al menos una CDR de una cadena ligera y/o pesada de inmunoglobulina que se une al antígeno de interés, en particular a CD40. A este respecto, un fragmento de unión a antígeno de los anticuerpos descritos en el presente documento puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o las 6 CDR de una secuencia de VH y VL expuesta en el presente documento a partir de anticuerpos que se unen a CD40. Un fragmento de unión a antígeno de los anticuerpos específicos de CD40 descritos en el presente documento puede unirse a CD40. En determinadas realizaciones, un fragmento de unión a antígeno o un anticuerpo que comprende un fragmento de unión a antígeno,

impide o inhibe la unión de CD40L al CD40. En determinadas realizaciones, el fragmento de unión a antígeno se une específicamente a y/o potencia o modula la actividad biológica de CD40 humano. Tal actividad biológica incluye, pero no se limita a, señalización celular, activación de células dendríticas.

El término “antígeno” se refiere a una molécula o una parte de una molécula a la que puede unirse un agente de unión selectiva, tal como un anticuerpo, y adicionalmente que puede usarse en un animal para producir anticuerpos que pueden unirse a un epítipo de este antígeno. Un antígeno puede tener uno o más epítipos.

El término “epítipo” incluye cualquier determinante, preferiblemente un determinante polipeptídico, que puede unirse específicamente a un receptor de células T o inmunoglobulina. Un epítipo es una región de un antígeno a la que se une un anticuerpo. En determinadas realizaciones, los determinantes de epítipo incluyen agrupaciones de superficie químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, fosforilo o sulfonilo, y pueden tener en determinadas realizaciones características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas. En determinadas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce preferiblemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. Se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación de equilibrio es $\leq 10^{-7}$ ó 10^{-8} M. En algunas realizaciones, la constante de disociación de equilibrio puede ser $\leq 10^{-9}$ M o $\leq 10^{-10}$ M.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos tal como se describe en el presente documento incluyen un conjunto de CDR de cadena ligera y cadena pesada, interpuestas respectivamente entre un conjunto de región de marco de cadena ligera y uno de cadena pesada (FR) que proporcionan soporte a las CDR y definen la relación espacial de las CDR unas en relación con las otras. Tal como se usa en el presente documento, el término “conjunto de CDR” se refiere a las tres regiones hipervariables de una región V de cadena ligera o pesada. Avanzando desde el extremo N-terminal de una cadena ligera o pesada, estas regiones se indican como “CDR1,” “CDR2” y “CDR3” respectivamente. Un sitio de unión a antígeno, por tanto, incluye seis CDR, que comprenden el conjunto de CDR de cada una de una región V de cadena pesada y una de ligera. Un polipéptido que comprende una única CDR, (por ejemplo, un CDR1, CDR2 o CDR3) se denomina en el presente documento “unidad de reconocimiento molecular” El análisis cristalográfico de varios complejos antígeno-anticuerpo ha demostrado que los residuos de aminoácido de CDR forman un contacto extenso con antígeno unido, en donde el contacto más extenso con el antígeno es con la CDR3 de cadena pesada. Por tanto, las unidades de reconocimiento moleculares son principalmente responsables de la especificidad de un sitio de unión a antígeno.

Tal como se usa en el presente documento, el término “conjunto de FR” se refiere a las cuatro secuencias de aminoácidos flanqueantes que enmarcan a las CDR de un conjunto de CDR de una región V de cadena ligera o pesada. Algunos residuos de FR pueden entrar en contacto con el antígeno unido; sin embargo, las FR son principalmente responsables de plegar la región V en el sitio de unión a antígeno, particularmente los residuos de FR directamente adyacentes a las CDR. Dentro de las FR, determinados residuos de amino y determinadas características estructurales están muy bien conservados. A este respecto, todas la secuencias de región V contienen un bucle de disulfuro interno de aproximadamente 90 residuos de aminoácido. Cuando las regiones V se pliegan en un sitio de unión, los CDR se despliegan como motivos de bucle salientes que forman una superficie de unión a antígeno. Se reconoce generalmente que hay regiones estructurales conservadas de FR que influyen en la forma plegada de los bucles de CDR en determinadas estructuras “canónicas” independientemente de la secuencia de aminoácidos de CDR concreta. Además, se sabe que determinados residuos de FR participan en contactos entre dominios no covalentes que estabilizan la interacción de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo.

Las estructuras y ubicaciones de dominios variables de inmunoglobulina pueden determinarse en referencia a Kabat, E. A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4ª edición. US Department of Health and Human Services. 1987, y actualizaciones del mismo, ahora disponibles en internet (immuno.bme.nwu.edu).

Un “anticuerpo monoclonal” se refiere a una población de anticuerpos homogénea en la que el anticuerpo monoclonal se compone de aminoácidos (que se producen de manera natural y que no se producen de manera natural) que están implicados en la unión selectiva de un epítipo. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único epítipo. El término “anticuerpo monoclonal” no abarca solamente anticuerpos monoclonales intactos y anticuerpos monoclonales de longitud completa, sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), cadena sencilla (ScFv), variantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una parte de unión a antígeno, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales quiméricos, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un fragmento de unión a antígeno (sitio de reconocimiento de epítipo) con la especificidad y capacidad requeridas para unirse a un epítipo. No se pretende limitarse en cuanto a la fuente del anticuerpo o a la manera en que se elabora (por ejemplo, mediante hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante, animales transgénicos, etc.). El término incluye inmunoglobulinas completas así como los fragmentos etc. descritos anteriormente en la definición de “anticuerpo”.

La enzima proteolítica papaína escinde de manera preferente las moléculas de IgG para producir varios fragmentos, dos de los cuales (los fragmentos F(ab)) comprenden cada uno un heterodímero covalente que incluye un sitio de unión a antígeno intacto. La enzima pepsina puede escindir las moléculas de IgG para proporcionar varios

fragmentos, que incluyen el fragmento $F(ab')_2$ que comprende ambos sitios de unión a antígeno. Un fragmento Fv para su uso según determinadas realizaciones de la presente invención puede producirse mediante escisión proteolítica preferente de una IgM, y en raras ocasiones de una molécula de inmunoglobulina IgG o IgA. Los fragmentos Fv se derivan, sin embargo, más habitualmente usando técnicas recombinantes conocidas en la técnica.

- 5 El fragmento Fv incluye un heterodímero $V_H::V_L$ no covalente que incluye un sitio de unión a antígeno que conserva muchas de las capacidades de unión a y reconocimiento de antígenos de la molécula de anticuerpo nativa. Inbar *et al.* (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69:2659-2662; Hochman *et al.* (1976) Biochem 15:2706-2710; y Ehrlich *et al.* (1980) Biochem 19:4091-4096.

- 10 En determinadas realizaciones, se contemplan anticuerpos Fv o scFV de cadena sencilla. Por ejemplo, pueden prepararse cuerpos Kappa (Ill *et al.*, Prot. Eng. 10: 949-57 (1997); minicuerpos (Martin *et al.*, EMBO J 13: 5305-9 (1994); diacuerpos (Holliger *et al.*, PNAS 90: 6444-8 (1993); o janusinas (Traunecker *et al.*, EMBO J 10: 3655-59 (1991) y Traunecker *et al.*, Int. J. Cancer Suppl. 7: 51-52 (1992), usando técnicas de biología molecular convencionales siguiendo las enseñanzas de la presente solicitud con respecto a la selección de anticuerpos que tienen la especificidad deseada. En aún otras realizaciones, pueden elaborarse anticuerpos quiméricos o
- 15 biespecíficos para abarcar los ligandos de la presente divulgación. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender regiones de marco y CDR de diferentes anticuerpos, mientras que pueden generarse anticuerpos biespecíficos para que se unan específicamente a CD40 a través de un dominio de unión y a una segunda molécula a través de un segundo dominio de unión. Estos anticuerpos pueden producirse a través de técnicas de biología molecular recombinantes o pueden conjugarse físicamente entre sí.

- 20 Un polipéptido de cadena sencilla Fv (sFv) es un heterodímero $V_H::V_L$ unido de manera covalente que se expresa a partir de una fusión génica que incluye genes que codifican para V_H y V_L unidos mediante un ligador que codifica para péptido. Huston *et al.* (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85(16):5879-5883. Se han descrito varios métodos para diferenciar estructuras químicas para convertir las cadenas de polipéptido pesadas y ligeras agregadas de manera natural (pero separadas químicamente) a partir de una región V de anticuerpo en una molécula de sFv que se
- 25 plegará para dar una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión a antígeno. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.091.513 y 5.132.405, concedidas a Huston *et al.*; y la patente estadounidense n.º. 4.946.778, concedida a Ladner *et al.*

- En determinadas realizaciones, un anticuerpo de unión a CD40 tal como se describe en el presente documento está en la forma de un diacuerpo. Los diacuerpos son multímeros de polipéptidos, comprendiendo cada polipéptido un
- 30 primer dominio que comprende una región de unión de una cadena ligera de inmunoglobulina y un segundo dominio que comprende una región de unión de una cadena pesada de inmunoglobulina, estando unidos los dos dominios (por ejemplo mediante un ligador peptídico) pero incapaces de asociarse entre sí para formar un sitio de unión a antígeno: los sitios de unión a antígeno se forman mediante la asociación del primer dominio de un polipéptido dentro del multímero con el segundo dominio de otro polipéptido dentro del multímero (documento WO94/13804).

- 35 Un fragmento dAb de un anticuerpo consiste en un dominio V_H (Ward, E. S. *et al.*, Nature 341, 544-546 (1989)).

- Cuando van a usarse anticuerpos biespecíficos, estos pueden ser anticuerpos biespecíficos convencionales, que pueden fabricarse de diferentes formas (Holliger, P. y Winter G. Current Opinion Biotechnol. 4, 446-449 (1993)), por ejemplo prepararse químicamente o a partir de hibridomas híbridos, o pueden ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpo biespecífico mencionados anteriormente. Pueden construirse diacuerpos y scFv sin una región Fc, usando
- 40 sólo dominios variables, lo que reduce posiblemente los efectos de una reacción antiidiotípica.

- Los diacuerpos biespecíficos, en contraposición a anticuerpos biespecíficos completos, pueden ser particularmente útiles porque pueden construirse de manera fácil y expresarse en *E. coli*. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos tales como fragmentos de anticuerpo) de especificidades de unión adecuadas pueden seleccionarse de manera fácil usando presentación en fagos (documento WO94/13804) de bibliotecas. Si una rama del diacuerpo va a mantenerse constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra el antígeno X, entonces puede
- 45 elaborarse una biblioteca donde se varía el otro brazo y se selecciona un anticuerpo de especificidad adecuada. Pueden elaborarse anticuerpos biespecíficos completos mediante ingeniería de "botón en ojal" (J. B. B. Ridgeway *et al.*, Protein Eng., 9, 616-621, 1996).

- En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden proporcionarse en forma de un UniBody®. Un UniBody® es un anticuerpo IgG4 con la región bisagra eliminada (véase GenMab Utrecht, Países Bajos; véase también, por ejemplo, el documento US20090226421). Esta tecnología de anticuerpos patentada crea un formato de anticuerpo más pequeño, estable con una ventana terapéutica anticipada más extensa que los formatos de anticuerpo pequeño actuales. Los anticuerpos IgG4 se consideran inertes y por tanto no interaccionan con el sistema inmunitario. Pueden modificarse anticuerpos IgG4 humanos completos eliminando la
- 50 región bisagra del anticuerpo para obtener fragmentos de media molécula que tienen propiedades de estabilidad diferentes en relación con la correspondiente IgG4 intacta (GenMab, Utrecht). Al dividir por la mitad la molécula de IgG4, queda sólo un área en el UniBody® que puede unirse a antígenos análogos (por ejemplo, dianas de enfermedades) y el UniBody® por tanto se une de forma univalente a un único sitio en células diana. Para ciertos antígenos de superficie de células cancerosas, esta unión univalente puede no estimular a las células cancerosas para que crezcan tal como puede observarse usando anticuerpos bivalentes que tienen la misma especificidad de
- 60

antígeno, y por lo tanto la tecnología UniBody® puede proporcionar opciones de tratamiento para algunos tipos de cáncer que pueden ser resistentes al tratamiento con anticuerpos convencionales. El pequeño tamaño del UniBody® puede ser un gran beneficio cuando se tratan algunas formas de cáncer, permitiendo una mejor distribución de la molécula sobre tumores sólidos más grandes y aumentando posiblemente la eficacia.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la presente divulgación pueden adoptar la forma de un nanobody. Los nanobodies se codifican mediante genes individuales y se producen eficazmente en la mayoría de huéspedes eucariotas y procariotas, por ejemplo *E. coli* (véase por ejemplo la patente estadounidense número 6.765.087), mohos (por ejemplo *Aspergillus* o *Trichoderma*) y levadura (por ejemplo *Saccharomyces*, *Kluyvermyces*, *Hansenula* o *Pichia* (véase por ejemplo la patente estadounidense número 6.838.254). El procedimiento de producción puede aumentarse a escala y se han producido cantidades de múltiples kilogramos de nanobodies. Pueden formularse nanobodies como una disolución lista para su uso que tiene una vida útil de almacenamiento prolongada. El método Nanoclone (véase, por ejemplo, el documento WO 06/079372) es un método patentado para generar nanobodies contra una diana deseada, basándose en la selección de alto rendimiento automatizada de células B.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD40 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos tal como se dan a conocer en el presente documento están humanizados. Esto se refiere a una molécula quimérica, generalmente preparada usando técnicas recombinantes, que tienen un sitio de unión a antígeno derivado de una inmunoglobulina de una especie no humana y la estructura de inmunoglobulina restante de la molécula basada en la estructura y/o la secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a antígeno puede comprender o bien dominios variable completos fusionados a dominios constantes o bien solamente las CDR injertadas en regiones de marco apropiadas en los dominios variables. Los sitios de unión a epítipo pueden ser silvestres o modificados por una o más sustituciones de aminoácido. Esto elimina la región constante como inmunógeno en individuos humanos, pero permanece la posibilidad de una respuesta inmunitaria frente a la región variable foránea (LoBuglio, A. F. *et al.*, (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:4220-4224; Queen *et al.*, PNAS (1988) 86:10029-10033; Riechmann *et al.*, Nature (1988) 332:323-327). Los métodos ilustrativos para la humanización de los anticuerpos anti-CD40 dados a conocer en el presente documento incluyen los métodos descritos en la patente estadounidense número 7.462.697. Los anticuerpos humanizados ilustrativos según determinadas realizaciones de la presente invención comprenden las secuencias humanizadas proporcionadas en SEQ ID NO:9 y 10.

Otro enfoque se centra no sólo en proporcionar regiones constantes derivadas de ser humano, sino también en modificar las regiones variables así como reorganizarlas tan próximas como sea posible a una forma humana. Se sabe que las regiones variables de cadenas ligeras como pesadas contienen tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) que varían en respuesta a los epítopos en cuestión y determinan la capacidad de unión, flanqueadas por cuatro regiones de marco (FR) que se conservan relativamente en una especie dada y que supuestamente proporcionan un andamiaje para las CDR. Cuando se preparan anticuerpos no humanos con respecto a un epítipo particular, las regiones variables pueden "reorganizarse" o "humanizarse" injertando CDR derivadas de anticuerpo no humano en las FR presentes en el anticuerpo humano que va a modificarse. La aplicación de este enfoque a diversos anticuerpos se ha notificado por Sato, K., *et al.*, (1993) Cancer Res 53:851-856; Riechmann, L., *et al.*, (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen, M., *et al.*, (1988) Science 239:1534-1536; Kettleborough, C. A., *et al.*, (1991) Protein Engineering 4:773-3783; Maeda, H., *et al.*, (1991) Human Antibodies Hybridoma 2:124-134; Gorman, S. D., *et al.*, (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:4181-4185; Tempest, P. R., *et al.*, (1991) Bio/Technology 9:266-271; Co, M. S., *et al.*, (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:2869-2873; Carter, P., *et al.*, (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-4289; y Co, M. S. *et al.*, (1992) J Immunol 148:1149-1154. En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR de los anticuerpos de ratón). En otras realizaciones, los anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco, seis) que se alteran con respecto al anticuerpo original, que se denominan también una o más CDR "derivadas de" una o más CDR del anticuerpo original.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la presente divulgación pueden ser anticuerpos quiméricos. A este respecto, un anticuerpo quimérico está compuesto por un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-CD40 operativamente unido o fusionado de otra manera a una parte de Fc heteróloga de un anticuerpo diferente. En determinadas realizaciones, el dominio de Fc heterólogo es de origen humano. En otras realizaciones, el dominio de Fc heterólogo puede ser de una clase de Ig diferente del anticuerpo original, incluyendo IgA (que incluye las subclases IgA1 e IgA2), IgD, IgE, IgG (incluyendo las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e IgM. En realizaciones adicionales, el dominio de Fc heterólogo puede estar compuesto por los dominios CH2 y CH3 de una o más de las diferentes clases de Ig. Tal como se indicó anteriormente con respecto a anticuerpos humanizados, el fragmento de unión a antígeno anti-CD40 de un anticuerpo quimérico puede comprender sólo uno o más de las CDR de los anticuerpos descritos en el presente documento (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 CDR de los anticuerpos descritos en el presente documento), o puede comprender un dominio variable entero (VL, VH o ambos).

En determinadas realizaciones, un anticuerpo que se une a CD40 comprende una o más de las CDR de los anticuerpos descritos en el presente documento. A este respecto, se ha demostrado en algunos casos que la transferencia de solamente la VHCDR3 de un anticuerpo puede realizarse mientras que aún conserva la unión específica deseada (Barbas *et al.*, PNAS (1995) 92: 2529-2533). Véase también, McLane *et al.*, PNAS (1995) 92:5214-5218, Barbas *et al.*, J. Am. Chem. Soc. (1994) 116:2161-2162.

Marks *et al* (Bio/Technology, 1992, 10:779-783) describen métodos de producción de repertorios de dominios variables de anticuerpo en los que se usan cebadores de consenso dirigidos a o adyacentes al extremo 5' del área de dominio variable junto con cebadores de consenso para la tercera región de marco de genes de VH humanos para proporcionar un repertorio de dominios variables VH que carecen de una CDR3. Marks *et al* describen adicionalmente cómo este repertorio puede combinarse con una CDR3 de un anticuerpo particular. Usando técnicas análogas, las secuencias derivadas de CDR3 de los anticuerpos descritos en el presente documento pueden intercambiarse con repertorios de dominios VH o VL que carecen de una CDR3, y los dominios VH o VL completos intercambiados pueden combinarse con un dominio VL o VH análogo para proporcionar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a CD40. El repertorio puede presentarse entonces en un sistema de huésped adecuado tal como el sistema de presentación en fagos del documento WO92/01047 de manera que pueden seleccionarse anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos adecuados. Un repertorio puede consistir en al menos de aproximadamente 10^4 miembros individuales y hacia arriba varios órdenes de magnitud, por ejemplo, hasta aproximadamente desde 10^6 hasta 10^8 ó 10^{10} o más miembros. Se dan a conocer también técnicas combinatorias o de intercambio análogas por Stemmer (Nature, 1994, 370:389-391), quien describe la técnica en relación a un gen de β -lactamasa pero observa que el enfoque puede usarse para la generación de anticuerpos.

Una alternativa adicional es generar regiones VH o VL novedosas que portan una o más secuencias derivadas de CDR de las realizaciones de la invención descrita en el presente documento usando mutagénesis aleatoria de uno o más genes de VH y/o VL seleccionados para generar mutaciones dentro del dominio variable entero. Una técnica de este tipo se describe por Gram *et al* (1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3576-3580), quienes usaron PCR propensa a error. Otro método que puede usarse es dirigir la mutagénesis a regiones CDR de genes de VH o VL. Técnicas de este tipo se dan a conocer por Barbas *et al.*, (1994, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:3809-3813) y Schier *et al* (1996, J. Mol. Biol. 263:551-567).

En determinadas realizaciones, una VH y/o VL específica de los anticuerpos descritos en el presente documento puede usarse para examinar una biblioteca del dominio variable complementario para identificar anticuerpos con propiedades deseadas, tales como afinidad aumentada por CD40. Métodos de este tipo se describen, por ejemplo, en Portolano *et al.*, J. Immunol. (1993) 150:880-887; Clarkson *et al.*, Nature (1991) 352:624-628.

Pueden usarse también otros métodos para mezclar y aparear las CDR para identificar anticuerpos que tienen la actividad de unión deseada, tal como unión a CD40. Por ejemplo: Klimka *et al.*, British Journal of Cancer (2000) 83: 252-260, describen un procedimiento de examen usando una biblioteca de VH humana y de VL de ratón con CDR3 y FR4 conservadas a partir de la VH de ratón. Tras obtener anticuerpos, la VH se examinó frente a una biblioteca de VL humana para obtener anticuerpos que se unían al antígeno. Beiboer *et al.*, J. Mol. Biol. (2000) 296:833-849 describen un procedimiento de examen usando una biblioteca de cadena ligera humana y cadena pesada de ratón completa. Tras obtener anticuerpos, se combinó una VL con una biblioteca de VH humana con la CDR3 del ratón conservada. Se obtuvieron anticuerpos capaces de unirse a antígeno. Rader *et al.*, PNAS (1998) 95:8910-8915 describen un procedimiento similar al anterior de Beiboer *et al.*

Las técnicas que acaban de describirse se conocen, en sí mismas, tal cual en la técnica. El experto en la técnica podrá, sin embargo, usar tales técnicas para obtener anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos según varias realizaciones de la invención descrita en el presente documento, usando metodología de rutina en la técnica.

También se da a conocer en el presente documento un método para obtener un dominio de unión a antígeno del anticuerpo específico para el antígeno CD40, comprendiendo el método proporcionar por medio de adición, delección, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio VH expuesto en el presente documento, un dominio VH que es una variante de la secuencia de aminoácidos del dominio VH, combinar opcionalmente el dominio VH así proporcionado con uno o más dominios VL y someter a prueba el dominio VH o combinación o combinaciones de VH/VL para identificar un miembro de unión específica o un dominio de unión a antígeno del anticuerpo específico para CD40 y opcionalmente con una o más propiedades deseadas. Los dominios VL pueden tener una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente tal como se expone en el presente documento. Puede emplearse un método análogo en el que una o más variantes de secuencia de un dominio VL dadas a conocer en el presente se combinan con uno o más dominios VH.

Un epítipo que "se une específicamente" o "se une preferentemente" (usados de manera intercambiable en el presente documento) a un anticuerpo o un polipéptido es un término bien entendido en la técnica, y métodos para determinar tal unión específica o preferente también se conocen bien en la técnica. Una molécula se dice que presenta "unión específica" o "unión preferente" si reacciona o se asocia de manera más frecuente, más fácil, con mayor duración y/o con mayor afinidad con una célula o sustancia particular que cuando lo hace con células o sustancias alternativas. Un anticuerpo "se une específicamente" o "se une preferentemente" a una diana si se une con mayor afinidad, avidez, de manera más fácil y/o con mayor duración que cuando se une a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específica o preferentemente a un epítipo de CD40 es un anticuerpo que se une a un epítipo de CD40 mayor afinidad, avidez, de manera más fácil y/o con mayor duración que cuando se une a otros epítipos de CD40 o epítipos distintos de CD40. Se entiende también leyendo esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o resto o epítipo) que se une específica o preferentemente a una primera diana puede unirse o no específica o preferentemente a una segunda diana. Como tal, "unión específica" o "unión preferente" no requiere de

manera necesaria (aunque puede incluir) unión exclusiva. Generalmente, pero no de manera necesaria, la referencia a unión significa unión preferente.

Unión inmunológica se refiere generalmente a las interacciones no covalentes del tipo que se producen entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el que la inmunoglobulina es específica, por ejemplo a modo de ilustración y no de limitación, como resultado de atracciones o repulsión electroestáticas, iónicas, hidrófilas y/o hidrófobas, fuerzas estéricas, puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y otras interacciones. La fuerza, o afinidad de interacciones de unión inmunológica puede expresarse en términos de la constante de disociación (K_d) de la interacción, en la que una K_d más pequeña representa una mayor afinidad. Las propiedades de unión inmunológica de polipéptidos seleccionados puede cuantificarse usando métodos bien conocidos en la técnica. Un método de este tipo implica medir las velocidades de formación y disociación del complejo de antígeno/sitio de unión a antígeno, en el que esas velocidades dependen de las concentraciones de las parejas del complejo, la afinidad de la interacción y de parámetros geométricos que influyen igualmente en la velocidad en ambas direcciones. Por tanto, tanto la "constante de velocidad de asociación" (K_{on}) como la "constante de velocidad de disociación" (K_{off}) pueden determinarse mediante el cálculo de las concentraciones y de las velocidades reales de asociación y disociación. La razón de K_{off}/K_{on} permite la cancelación de todos los parámetros no relacionados con la afinidad, y es por tanto igual a la constante de disociación K_d . Véase, generalmente, Davies *et al.* (1990) Annual Rev. Biochem. 59:439-473.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD40 descritos en el presente documento tienen una afinidad de aproximadamente 100, 150, 155, 160, 170, 175, 180, 185, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198 ó 199 picomolar, y en algunas realizaciones, los anticuerpos pueden tener incluso mayor afinidad por CD40.

El término "inmunológicamente activo", con referencia a un epítipo que es o "sigue siendo inmunológicamente activo", se refiere a la capacidad de un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-CD40) para unirse al epítipo en condiciones diferentes, por ejemplo, tras haberse sometido al epítipo a condiciones de reducción y desnaturalización.

Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según determinadas realizaciones preferidas de la presente solicitud puede ser uno que compite por la unión a CD40 con cualquier anticuerpo descrito en el presente documento que tanto (i) se une específicamente al antígeno como (ii) comprende un dominio de VH y/o VL dado a conocer en el presente documento, o comprende una CDR3 de VH dada a conocer en el presente documento, o una variante de cualquiera de estos. La competición entre los anticuerpos puede someterse a ensayo fácilmente *in vitro*, por ejemplo usando ELISA y/o etiquetando con una molécula indicadora específica a un anticuerpo que puede detectarse en presencia de otros anticuerpos no etiquetados, para permitir la identificación de anticuerpos específicos que se unen al mismo epítipo o un epítipo solapante. Por tanto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo específico o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende un sitio de unión a antígeno de anticuerpo humano que compite con un anticuerpo descrito en el presente documento que se une a CD40.

En este sentido, tal como se usa en el presente documento, los términos "compite con", "inhibe la unión" y "bloquea la unión" (por ejemplo, en referencia a inhibición/bloqueo de la unión de CD40L a CD40 o en referencia a inhibición/bloqueo de la unión de un anticuerpo anti-CD40 a CD40) se usan indistintamente y abarcan inhibición/bloqueo tanto parcial como completo. También se pretende que la inhibición y el bloqueo incluyan cualquier disminución medible en la unión de CD40L a CD40 cuando está en contacto con un anticuerpo anti-CD40 tal como se da a conocer en el presente documento en comparación con el ligando que no está en contacto con un anticuerpo anti-CD40, por ejemplo, el bloqueo de CD40L a CD40 en al menos aproximadamente el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100%.

Las regiones constantes de las inmunoglobulinas muestran menos diversidad de secuencia que las regiones variables, y son responsables de la unión de varias proteínas naturales para provocar importantes acontecimientos bioquímicos. En seres humanos, hay cinco clases diferentes de anticuerpos incluyendo IgA (que incluye las subclases IgA1 e IgA2), IgD, IgE, IgG (que incluye las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e IgM. Las características distintivas entre estas clases de anticuerpos son sus regiones constantes, aunque pueden existir diferencias más sutiles en la región V.

La región Fc de un anticuerpo interacciona con varios receptores y ligandos de Fc, confiriendo una serie de importantes capacidades funcionales denominadas funciones efectoras. Para IgG, la región Fc comprende los dominios de Ig CH2 y CH3 y la bisagra N-terminal que conduce a CH2. Una importante familia de receptores de Fc para la clase de IgG son los receptores de Fc gamma ($Fc\gamma R$). Estos receptores median en la comunicación entre anticuerpos y el brazo celular del sistema inmunitario (Raghavan *et al.*, 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ravetch *et al.*, 2001, Annu Rev Immunol 19:275-290). En seres humanos, esta familia de proteínas incluye $Fc\gamma RI$ (CD64), que incluye las isoformas $Fc\gamma RIa$, $Fc\gamma RIb$ y $Fc\gamma RIc$; $Fc\gamma RII$ (CD32), que incluye las isoformas $Fc\gamma RIIa$ (incluyendo los alotipos H131 y R131), $Fc\gamma RIIb$ (que incluye $Fc\gamma RIIb-1$ y $Fc\gamma RIIb-2$) y $Fc\gamma RIIfc$; y $Fc\gamma RIIfc$ (CD16), que incluye las isoformas $Fc\gamma RIIfc$ (incluyendo los alotipos V158 y F158) y $Fc\gamma RIIfc$ (incluyendo los alotipos $Fc\gamma RIIfc-NA1$ y $Fc\gamma RIIfc-NA2$) (Jefferis *et al.*, 2002, Immunol Lett 82:57-65). Estos receptores tienen normalmente un dominio extracelular que media en la unión a Fc, una región que abarca la membrana y un dominio intracelular que puede

mediar en algún acontecimiento de señalización dentro de la célula. Estos receptores se expresan en una variedad de células inmunitarias incluyendo monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, células B, linfocitos granulares grandes, células de Langerhans, células citolíticas naturales (NK) y células T. La formación del complejo Fc/Fc γ R recluta estas células efectoras a sitios de antígeno unido, dando como resultado normalmente acontecimientos de señalización dentro de las células e importantes respuestas inmunitarias posteriores tales como liberación de mediadores de inflamación, activación de células B, endocitosis, fagocitosis y ataque citotóxico.

La capacidad para mediar en funciones efectoras citotóxicas y fagocíticas es un posible mecanismo mediante el cual los anticuerpos destruyen células seleccionadas como diana. La reacción mediada por células en la que células citotóxicas inespecíficas que expresan Fc γ R reconocen anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula diana se denomina citotoxicidad celular mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA) (Raghavan *et al.*, 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ghetie *et al.*, 2000, Annu Rev Immunol 18:739-766; Ravetch *et al.*, 2001, Annu Rev Immunol 19:275-290). La reacción mediada por células en la que células citotóxicas inespecíficas que expresan Fc γ R reconocen anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan la fagocitosis de la célula diana se denomina fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP). Todos los Fc γ R se unen a la misma región en Fc, en el extremo N-terminal del dominio Cg2 (CH2) y la bisagra anterior. Esta interacción está bien caracterizada estructuralmente (Sondermann *et al.*, 2001, J Mol Biol 309:737-749), y se han resuelto varias estructuras de la Fc humana unida al dominio extracelular de Fc γ R11b humano (código de registro de pdb 1E4K) (Sondermann *et al.*, 2000, Nature 406:267-273). (Códigos de registro de pdb 1IIS y 1IIX) (Radaev *et al.*, 2001, J Biol Chem 276:16469-16477).

Las diferentes subclases de IgG tienen diferentes afinidades por los Fc γ R, uniéndose normalmente IgG1 e IgG3 sustancialmente mejor a los receptores que IgG2 e IgG4 (Jefferis *et al.*, 2002, Immunol Lett 82:57-65). Todos los Fc γ R se unen a la misma región en Fc de IgG, aunque con diferentes afinidades: el agente de unión de alta afinidad Fc γ R1 tiene una Kd para IgG1 de 10^{-8} M $^{-1}$, mientras que los receptores de baja afinidad Fc γ R2 y Fc γ R3 se unen generalmente a 10^{-6} y 10^{-5} respectivamente. Los dominios extracelulares de Fc γ R11a y Fc γ R11b son idénticos al 96%, sin embargo Fc γ R11b no tiene un dominio de señalización intracelular. Además, mientras que Fc γ R1, Fc γ R11a/c, y Fc γ R11a son reguladores positivos de la activación desencadenada por complejos inmunitarios, caracterizados por tener un dominio intracelular que tiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora (ITAM), Fc γ R11b tiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM) y, es por tanto, inhibidor. Por tanto, los primeros se denominan receptores de activación, y Fc γ R11b se denomina receptor inhibidor. Los receptores también difieren en el patrón de expresión y los niveles en diferentes células inmunitarias. Aún otro nivel de complejidad es la existencia de varios polimorfismos de Fc γ R en el proteoma humano. Un polimorfismo particularmente relevante con significación clínica es V158/F158 Fc γ R11a. IgG1 humana se une con mayor afinidad al alotipo V158 que al alotipo F158. Esta diferencia de afinidad, y presumiblemente su efecto sobre CCDA y/o ADCP, se ha mostrado que es un determinante significativo de la eficacia del anticuerpo anti-CD20 rituximab (Rituxan®, una marca comercial registrada de IDEC Pharmaceuticals Corporation). Pacientes con el alotipo V158 responden favorablemente al tratamiento con rituximab; sin embargo, pacientes con el alotipo F158 de afinidad inferior responden mal (Cartron *et al.*, 2002, Blood 99:754-758). Aproximadamente el 10-20% de los seres humanos son homocigotos V158/V158, el 45% son heterocigotos V158/F158 y el 35-45% de los seres humanos son homocigotos F158/F158 (Lehrnbecher *et al.*, 1999, Blood 94:4220-4232; Cartron *et al.*, 2002, Blood 99:754-758). Por tanto el 80-90% de los seres humanos responden mal, es decir tienen al menos un alelo del F158 Fc γ R11a.

La región Fc está también implicada en la activación de la cascada del complemento. En la ruta clásica del complemento, C1 se une con sus subunidades C1q a fragmentos de Fc de IgG o IgM, que ha formado un complejo con antígeno(s). En determinadas realizaciones de la invención, modificaciones en la región Fc comprenden modificaciones que alteran (o bien potencian o bien disminuyen) la capacidad de un anticuerpo específico de CD40 tal como se describe en el presente documento para activar el sistema del complemento (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 7.740.847). Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods, 202:163 (1996)).

Por tanto, en determinadas realizaciones, la presente invención proporciona anticuerpos anti-CD40 que tienen una región Fc modificada con propiedades funcionales alteradas, tales como actividad de CDC, CCDA o ADCP reducida o potenciada, o afinidad de unión potenciada para un Fc γ R específico o semivida en suero aumentada. Otras regiones Fc modificadas contempladas en el presente documento se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses concedidas 7.317.091; 7.657.380; 7.662.925; 6.538.124; 6.528.624; 7.297.775; 7.364.731; las solicitudes estadounidenses publicadas US2009092599; US20080131435; US20080138344; y las solicitudes internacionales publicadas WO2006/105338; WO2004/063351; WO2006/088494; WO2007/024249.

Por tanto, en determinadas realizaciones, se fusionan dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas a secuencias de dominios constantes de inmunoglobulina. En determinadas realizaciones, la fusión es con un dominio constante de cadena pesada de Ig, que comprende al menos parte de la bisagra, las regiones C μ 2 y C μ 3. Se prefiere que tenga la primera región constante de cadena pesada (C μ 1) que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Se insertan ADN que codifican

para la las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, en vectores de expresión separados, y se transfectan conjuntamente en una célula huésped adecuada. Esto proporciona mayor flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones cuando razones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan el rendimiento óptimo del anticuerpo biespecífico deseado. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un único vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en razones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las razones no tienen un efecto significativo sobre el rendimiento de la combinación de cadenas deseada.

También pueden modificarse anticuerpos de la presente invención (y fragmentos de unión a antígeno y variantes de los mismos) para que incluyan un marcador o etiqueta de epítipo, por ejemplo, para su uso en aplicaciones de purificación o diagnóstico. Hay muchos grupos de unión conocidos en la técnica para preparar conjugados de anticuerpos, incluyendo, por ejemplo, los dados a conocer en la patente estadounidense n.º 5.208.020 o la patente EP 0 425 235 B1, y Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992). Los grupos de unión incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos ácido lábil, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasas o grupos lábiles a esterases, tal como se da a conocer en las patentes identificadas anteriormente, prefiriéndose grupos disulfuro y tioéter.

En otra realización contemplada, un anticuerpo específico de CD40 tal como se describe en el presente documento puede conjugarse o unirse operativamente con otro compuesto terapéutico, denominado en el presente documento conjugado. El conjugado puede ser un agente citotóxico, un agente quimioterápico, una citocina, un agente antiangiogénico, un inhibidor de tirosina cinasa, una toxina, un radioisótopo u otro agente terapéuticamente activo. Se han descrito anteriormente agentes quimioterápicos, citocinas, agentes antiangiogénicos, inhibidores de tirosina cinasa y otros agentes terapéuticos, y todos estos agentes terapéuticos mencionados anteriormente pueden encontrar uso como conjugados de anticuerpo.

En una realización alternativa, el anticuerpo se conjuga o se une operativamente a una toxina, incluyendo pero sin limitarse a toxinas de molécula pequeña y toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas. Las toxinas de molécula pequeña incluyen pero no se limitan a saporina (Kuroda K, *et al.*, The Prostate 70:1286-1294 (2010); Lip, WL. *et al.*, 2007 Molecular Pharmaceutics 4:241-251; Quadros EV., *et al.*, 2010 Mol Cancer Ther; 9(11); 3033-40; Polito L., *et al.* 2009 British Journal of Haematology, 147, 710-718), caliqueamicina, maitansina (patente estadounidense n.º 5.208.020), tricoteno y CC1065. Las toxinas incluyen pero no se limitan a ARNasa, gelonina, enediinas, ricina, abrina, toxina diftérica, toxina del cólera, gelonina, endotoxina de *Pseudomonas* (PE40), toxina de *Shigella*, toxina de *Clostridium perfringens* y proteína antiviral de fitolaca.

En una realización, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la divulgación se conjuga con una o más moléculas de maitansinoide. Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto del este de África *Maytenus serrata* (patente estadounidense n.º 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que determinados microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (patente estadounidense n.º 4.151.042). Se dan a conocer maitansinol sintético y derivados y análogos del mismo, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533. Se dan a conocer inmunoconjugados que contienen maitansinoides y su uso terapéutico, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1. Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describieron inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide designado DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra cáncer colorrectal humano. Se encontró que el conjugado era altamente citotóxico hacia células de cáncer de colon cultivadas, y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*.

Se preparan conjugados de anticuerpo-maitansinoide uniendo químicamente un anticuerpo a una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica de la molécula de o bien anticuerpo o bien maitansinoide. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo ha mostrado eficacia en la potenciación de la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente a la función o solubilidad del anticuerpo, aunque se esperaría que incluso una molécula de toxina/anticuerpo potenciada la citotoxicidad con respecto al uso del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides se conocen bien en la técnica y pueden sintetizarse mediante técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Se dan a conocer maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5.208.020 y en las otras patentes y publicaciones no de patente a las que se hizo referencia anteriormente en el presente documento. Maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como diversos ésteres de maitansinol.

Otro conjugado de interés comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de caliqueamicina de antibióticos puede producir roturas en ADN bicatenario a concentraciones sub-picomolares. También pueden usarse análogos estructurales de caliqueamicina (Hinman *et al.*, 1993, Cancer Research 53:3336-3342; Lode *et al.*, 1998, Cancer Research 58:2925-2928) (patente estadounidense n.º 5.714.586;

patente estadounidense n.º 5.712.374; patente estadounidense n.º 5.264.586; patente estadounidense n.º 5.773.001). Análogos de dolastatina 10 tales como auristatina E (AE) y monometilauristatina E (MMAE) pueden encontrar uso como conjugados para los anticuerpos dados a conocer en el presente documento, o variantes de los mismos (Doronina *et al.*, 2003, Nat Biotechnol 21(7):778-84; Francisco *et al.*, 2003 Blood 102(4):1458-65). Las toxinas enzimáticamente activas útiles incluyen, pero no se limitan a cadena de difteria A, fragmentos activos que no se unen de toxina diftérica, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento PCT WO 93/21232. La presente divulgación contempla además realizaciones en las que se forma un conjugado o una fusión entre un anticuerpo específico de CD40 tal como se describe en el presente documento y un compuesto con actividad nucleolítica, por ejemplo una ribonucleasa o ADN endonucleasa tal como una desoxirribonucleasa (ADNasa).

En una realización alternativa, un anticuerpo dado a conocer en el presente documento puede conjugarse o unirse operativamente con un radioisótopo para formar un radioconjugado. Están disponibles una variedad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a ⁹⁰Y, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ²¹¹At y ²¹²Bi.

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden conjugarse en otras determinadas realizaciones con un resto terapéutico tal como una citotoxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida), un agente terapéutico o un elemento radiactivo (por ejemplo, emisores alfa, emisores gamma, etc.). Las citotoxinas o agentes citotóxicos incluyen cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxel/paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Una citotoxina a modo de ejemplo preferida es saporina (disponible de Advanced Targeting Systems, San Diego, CA). Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracildecabazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cisdiclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC), y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Además, un anticuerpo específico de CD40 (incluyendo un fragmento funcional del mismo tal como se proporciona en el presente documento tal como un fragmento de unión a antígeno) puede en determinadas realizaciones conjugarse con restos terapéuticos tales como materiales radiactivos o quelantes macrocíclicos útiles para conjugar iones de radiometales. En determinadas realizaciones, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) que puede unirse al anticuerpo por medio de una molécula de ligador. Tales moléculas de ligador se conocen comúnmente en la técnica y se describen en Denardo *et al.*, 1998, Clin Cancer Res. 4:2483-90; Peterson *et al.*, 1999, Bioconjug. Chem. 10:553; y Zimmerman *et al.*, 1999, Nucl. Med. Biol. 26:943-50.

En aún otra realización, un anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (tal como estreptavidina) para su utilización en la selección como diana previa de tumores en la que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido por la eliminación del conjugado no unido de la circulación usando un agente de aclaramiento y luego la administración de un "ligando" (por ejemplo avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo un radionucleótido). En una realización alternativa, el anticuerpo se conjuga o se une operativamente con una enzima con el fin de emplear terapia de profármaco mediada por enzimas dependiente de anticuerpo (ADEPT). Puede usarse ADEPT conjugando o uniendo operativamente el anticuerpo a una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo un agente quimioterápico de peptidilo, véase el documento PCT WO 81/01145) en un fármaco anticancerígeno activo. Véanse, por ejemplo, el documento PCT WO 88/07378 y la patente estadounidense n.º 4.975.278. El componente enzimático del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima que pueda actuar sobre un profármaco de un modo tal como para convertirlo en su forma más activa, citotóxica. Las enzimas que son útiles en el método de estas realizaciones y relacionadas incluyen pero no se limitan a fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticancerígeno, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como proteasa de *Serratia*, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácido; enzimas de escisión de hidratos de carbono tales como α -galactosidasa y neuramimidasa útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; beta-lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con β -lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasa, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, pueden usarse anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas", para convertir profármacos

en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, 1987, Nature 328: 457-458). Pueden prepararse conjugados de anticuerpo-abzima para la administración de la abzima a una población de células tumorales.

Pueden prepararse inmunoconjugados usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCL), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoi)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoi)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Los agentes de acoplamiento particulares incluyen 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) (Carlsson *et al.*, Biochem. J. 173:723-737 [1978]) y 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP) para proporcionar una unión disulfuro. El ligador puede ser un "ligador escindible" que facilita la liberación de uno o más componentes escindibles. Por ejemplo, puede usarse un ligador lábil a ácido (Cancer Research 52: 127-131 (1992); patente estadounidense n.º 5.208.020).

Otras modificaciones de los anticuerpos (y polipéptidos) de la invención también se contemplan en el presente documento. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. El anticuerpo también puede atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente), en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Tales técnicas se dan a conocer en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980).

Los "portadores" tal como se usa en el presente documento incluyen portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o mamífero que se expone a los mismos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo el portador fisiológicamente aceptable es una disolución acuosa de pH tamponado. Los ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como polisorbato 20 (TWEEN™), polietilenglicol (PEG) y poloxámeros (PLURONICS™), y similares.

Tal como se indica en otra parte en el presente documento, los anticuerpos de la presente divulgación inducen señalización de CD40 en células tumorales, activan células dendríticas y la vigilancia inmunitaria, activan la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) contra células tumorales, bloquean la unión de CD40 a CD40L; tienen actividad agonista de CD40; activan células presentadoras de antígeno; estimulan la liberación de citocinas de células presentadoras de antígeno; inducen apoptosis de células tumorales; inhiben la proliferación de células tumorales; destruyen células tumorales por medio de la inducción de funciones efectoras incluyendo pero sin limitarse a CCDA, CDC y ADCP; estimulan respuestas de células T antitumorales; reducen tumores establecidos; e inhiben tumores resistentes a rituximab. Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden tener o inducir una combinación de uno cualquiera o más de estos atributos o actividades. Las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-CD40 pueden evaluarse usando una variedad de métodos conocidos por el experto, tales ensayos de afinidad/unión (por ejemplo, resonancia de plasmón superficial, ensayos de inhibición por competición); ensayos de citotoxicidad, ensayos de viabilidad celular, ensayos de proliferación, activación o diferenciación celular, ensayos de CCDA y CDC, otra actividad celular que resulta de acontecimientos de señalización celular de CD40 (por ejemplo, fosforilación de STAT3, producción de citocinas incluyendo IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF-alfa y MIP1alfa), e inhibición del crecimiento tumoral y/o de células cancerosas usando modelos *in vitro* o *in vivo*. Otros ensayos pueden someter a prueba la capacidad de los anticuerpos descritos en el presente documento para bloquear la unión normal de CD40L a CD40 o respuestas mediadas por CD40, tales como señalización celular, activación celular (por ejemplo, activación, proliferación de células inmunitarias; activación de células presentadoras de antígeno (por ejemplo, células dendríticas, células B, macrófagos) y ensayos de maduración), respuestas inmunitarias (incluyendo respuestas humoral y mediada por células), etc. Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden someterse a prueba también para determinar efectos sobre la internalización de CD40, eficacia *in vitro* e *in vivo*, etc. Tales ensayos pueden realizarse usando protocolos bien establecidos conocidos por el experto (véanse, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, NY); Current Protocols in Immunology (editado por: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Etan M. Shevach, Warren Strober 2001 John Wiley & Sons, NY, NY); o kits comercialmente disponibles.

La presente invención proporciona además en determinadas realizaciones un ácido nucleico aislado que codifica para un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica para una CDR o un dominio VH o VL tal como se describe en el presente documento. Los ácidos nucleicos incluyen ADN y ARN. Estas realizaciones y relacionadas pueden incluir polinucleótidos que codifican para anticuerpos que se unen a CD40 tal como se describe en el presente documento.

El término “polinucleótido aislado” tal como se usa en el presente documento significará un polinucleótido de origen genómico, de ADNc o sintético o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen el polinucleótido aislado (1) no está asociado con todo o una porción de un polinucleótido en el que el polinucleótido aislado se encuentra en la naturaleza, (2) está unido a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza o (3) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

El término “operativamente unido” significa que los componentes a los que se aplica el término están en una relación que les permite llevar a cabo sus funciones inherentes en condiciones adecuadas. Por ejemplo, una secuencia de control de la transcripción “operativamente unida” a una secuencia codificante de proteína está ligada a la misma de modo que la expresión de la secuencia codificante de proteína se logra en condiciones compatibles con la actividad transcripcional de las secuencias de control.

El término “secuencia de control” tal como se usa en el presente documento se refiere a secuencias de polinucleótido pueden afectar a la expresión, el procesamiento o la localización intracelular de secuencias codificantes a las que están ligadas u operativamente unidas. La naturaleza de tales secuencias de control puede depender del organismo huésped. En realizaciones particulares, las secuencias de control de la transcripción para procariotas pueden incluir un promotor, un sitio de unión al ribosoma y una secuencia de terminación de la transcripción. En otras realizaciones particulares, las secuencias de control de la transcripción para eucariotas pueden incluir promotores que comprenden uno o una pluralidad de sitios de reconocimiento para factores de transcripción, secuencias potenciadoras de la transcripción, secuencias de terminación de la transcripción y secuencias de poliadenilación. En determinadas realizaciones, las “secuencias de control” pueden incluir secuencias líder y/o secuencias de pareja de fusión.

El término “polinucleótido” tal como se le hace referencia en el presente documento significa polímeros de ácido nucleico monocatenarios o bicatenarios. En determinadas realizaciones, los nucleótidos que comprenden el polinucleótido pueden ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Dichas modificaciones incluyen modificaciones de bases tales como bromouridina, modificaciones de ribosa tales como arabinósido y 2',3'-didesoxirribosa y modificaciones de las uniones entre nucleótidos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforanilato y fosforoamidoato. El término “polinucleótido” incluye específicamente formas mono y bicatenarias de ADN.

El término “nucleótidos que se producen de manera natural” incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término “nucleótidos modificados” incluye nucleótidos con grupos azúcar modificados o sustituidos y similares. El término “uniones de oligonucleótidos” incluye uniones de oligonucleótidos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforanilato, fosforoamidoato, y similares. Véanse, por ejemplo, LaPlanche *et al.*, 1986, Nucl. Acids Res., 14:9081; Stec *et al.*, 1984, J. Am. Chem. Soc., 106:6077; Stein *et al.*, 1988, Nucl. Acids Res., 16:3209; Zon *et al.*, 1991, Anti-Cancer Drug Design, 6:539; Zon *et al.*, 1991, OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH, págs. 87-108 (F. Eckstein, Ed.), Oxford University Press, Oxford, Inglaterra; Stec *et al.*, patente estadounidense n.º 5.151.510; Uhlmann y Peyman, 1990, Chemical Reviews, 90:543. Un oligonucleótido puede incluir un marcador detectable para permitir la detección del oligonucleótido o la hibridación del mismo.

El término “vector” se usa para referirse a cualquier molécula (por ejemplo, ácido nucleico, plásmido o virus) usado para transferir información de codificación a una célula huésped. El término “vector de expresión” se refiere a un vector que es adecuado para la transformación de una célula huésped y contiene secuencias de ácido nucleico que dirigen y/o controlan la expresión de secuencias de ácido nucleico heterólogas insertadas. La expresión incluye, pero no se limita a, procesos tales como transcripción, traducción y corte y empalme del ARN, si están presentes intrones.

Tal como entenderán los expertos en la técnica, los polinucleótidos pueden incluir secuencias genómicas, secuencias extragenómicas y codificadas por plásmido y segmentos génicos diseñados por ingeniería genética más pequeños que expresan, o pueden adaptarse para que expresen, proteínas, polipéptidos, péptidos y similares. Tales segmentos pueden aislarse de manera natural, o modificarse de manera sintética por el experto.

Tal como también reconocerá el experto en la técnica, los polinucleótidos pueden ser monocatenarios (codificantes o antisentido) o bicatenarios, y pueden ser moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o de ARN. Las moléculas de ARN pueden incluir moléculas de ARNhn, que contienen intrones y corresponden a una molécula de ADN de una manera uno a uno, y moléculas de ARNm, que no contienen intrones. Pueden estar presentes, pero no es necesario, moléculas codificantes o no codificantes adicionales dentro de un polinucleótido según la presente divulgación, y un polinucleótido puede estar unido, pero no es necesario, a otras moléculas y/o materiales de soporte. Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa o pueden comprender una secuencia que codifica para una variante o un derivado de una secuencia de este tipo.

Por tanto, según estas realizaciones y relacionadas, la presente divulgación también proporciona polinucleótidos que codifican para los anticuerpos anti-CD40 descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, se proporcionan polinucleótidos que comprenden parte de o toda una secuencia de polinucleótido que codifica para un anticuerpo tal como se describe en el presente documento y complementos de tales polinucleótidos.

En otras realizaciones relacionadas, las variantes de polinucleótido pueden tener una identidad sustancial con una secuencia de polinucleótido que codifica para un anticuerpo anti-CD40 descrito en el presente documento. Por ejemplo, un polinucleótido puede ser un polinucleótido que comprende una identidad de secuencia de al menos el 70%, preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% o más, en comparación con una secuencia de polinucleótido de referencia tal como una secuencia que codifica para un anticuerpo descrito en el presente documento, usando los métodos descritos en el presente documento, (por ejemplo, análisis de BLAST usando parámetros convencionales, tal como se describe más adelante). Un experto en esta técnica reconocerá que estos valores pueden ajustarse apropiadamente para determinar la identidad de proteínas correspondiente codificadas por dos secuencias de nucleótidos teniendo en cuenta la degeneración de codones, la similitud de aminoácidos, la situación del marco de lectura y similares.

Normalmente, las variantes de polinucleótido contendrán una o más sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones, preferiblemente de manera que la afinidad de unión del anticuerpo codificado por el polinucleótido variante no disminuye sustancialmente en relación con un anticuerpo codificado por una secuencia de polinucleótido específicamente expuesta en el presente documento.

En otras determinadas realizaciones relacionadas, los fragmentos de polinucleótido pueden comprender o consistir esencialmente en diversas longitudes de tramos contiguos de secuencia idéntica a o complementaria a una secuencia que codifica para un anticuerpo tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, se proporcionan polinucleótidos que comprenden o consisten esencialmente en al menos aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 300, 400, 500 ó 1000 o más nucleótidos contiguos de una secuencia que codifica para un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, dado a conocer en el presente documento así como longitudes intermedias entre ellos. Se entenderá fácilmente que "longitudes intermedias", en este contexto, significa cualquier longitud entre los valores indicados, tales como 50, 51, 52, 53, etc.; 100, 101, 102, 103, etc.; 150, 151, 152, 153, etc.; incluyendo todos los números enteros entre 200-500; 500-1.000, y similares. Una secuencia de polinucleótido tal como se describe en el presente documento puede extenderse en uno o ambos extremos mediante nucleótidos adicionales no encontrados en la secuencia nativa. Esta secuencia adicional puede consistir en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 nucleótidos en cualquier extremo de un polinucleótido que codifica para un anticuerpo descrito en el presente documento o en ambos extremos de un polinucleótido que codifica para un anticuerpo descrito en el presente documento.

En otra realización, se proporcionan polinucleótidos que pueden hibridarse en condiciones de rigurosidad moderada a alta con una secuencia de polinucleótido que codifica para un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, proporcionado en el presente documento, o un fragmento del mismo, o una secuencia complementaria del mismo. En la técnica de biología molecular se conocen bien técnicas de hibridación. Para fines de ilustración, condiciones de rigurosidad moderadamente rigurosas para someter a prueba la hibridación de un polinucleótido tal como se proporcionan en el presente documento con otros polinucleótidos incluyen lavar previamente en una disolución de 5 X SSC, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0); hibridar a 50°C-60°C, 5 X SSC, durante la noche; seguido por lavar dos veces a 65°C durante 20 minutos con cada uno de 2X, 0,5X y 0,2X SSC que contienen SDS al 0,1%. Un experto en la técnica entenderá que la rigurosidad de la hibridación puede manipularse fácilmente, tal como alterando el contenido en sal de la disolución de hibridación y/o la temperatura a la que se realiza la hibridación. Por ejemplo, en otra realización, las condiciones de hibridación altamente rigurosas incluyen las descritas anteriormente, con la excepción de que la temperatura de hibridación se aumenta, por ejemplo, hasta 60°C-65°C o 65°C-70°C.

En determinadas realizaciones, los polinucleótidos descritos anteriormente, por ejemplo, variantes de polinucleótido, fragmentos y secuencias de hibridación, codifican para anticuerpos que se unen a CD40, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En otras realizaciones, tales polinucleótidos codifican para anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, o CDR de los mismos, que se unen a CD40 al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 70% y en determinadas realizaciones, al menos aproximadamente el 90% así como una secuencia de anticuerpo expuesta específicamente en el presente documento. En realizaciones adicionales, tales polinucleótidos codifican para anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, o CDR de los mismos, que se unen a CD40 con mayor afinidad que los anticuerpos expuestos en el presente documento, por ejemplo, que se unen cuantitativamente al menos aproximadamente el 105%, el 106%, el 107%, el 108%, el 109% o el 110% así como una secuencia de anticuerpo expuesta específicamente en el presente documento.

Tal como se describe en otra parte en el presente documento, la determinación de las estructuras tridimensionales de polipéptidos representativos (por ejemplo, anticuerpos específicos de CD40 variantes tal como se proporcionan en el presente documento, por ejemplo, una proteína de anticuerpo que tiene un fragmento de unión a antígeno tal como se proporciona en el presente documento) puede hacerse a través de metodologías de rutina de manera que la sustitución, adición, deleción o inserción de uno o más aminoácidos con aminoácidos naturales o no naturales seleccionados puede modelarse prácticamente para fines de determinar si una variante estructural así derivada conserva las propiedades de relleno de espacios de las especies dadas a conocer en el presente documento. El experto en la técnica conoce una variedad de programas informáticos para determinar sustituciones de aminoácidos apropiadas (o polinucleótidos apropiados que codifican para la secuencia de aminoácidos) dentro de un anticuerpo

de manera que, por ejemplo, se mantenga la afinidad o se logre una afinidad mejor.

Los polinucleótidos descritos en el presente documento, o fragmentos de los mismos, independientemente de la longitud de la propia secuencia codificante, pueden combinarse con otras secuencias de ADN, tales como promotores, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción adicionales, sitios de clonación múltiple, otros segmentos codificantes, y similares, de manera que su longitud global puede variar considerablemente. Por tanto, se contempla que pueda emplearse un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud, estando limitada la longitud total preferiblemente por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante previsto. Por ejemplo, se contempla que segmentos de polinucleótido ilustrativos con longitudes totales de aproximadamente 10.000, aproximadamente 5000, aproximadamente 3000, aproximadamente 2.000, aproximadamente 1.000, aproximadamente 500, aproximadamente 200, aproximadamente 100, aproximadamente 50 pares de bases de longitud, y similares (incluyendo todas las longitudes intermedias) sean útiles.

Cuando se comparan secuencias de polinucleótido, se dice que dos secuencias son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para lograr una correspondencia máxima, tal como se describe a continuación. Las comparaciones entre dos secuencias se realizan normalmente comparando las secuencias a lo largo de una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, de habitualmente 30 a aproximadamente 75, de 40 a aproximadamente 50, en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas tras alinearse de manera óptima las dos secuencias.

La alineación óptima de secuencias para comparación puede realizarse usando el programa Megalign en el paquete Lasergene de software de bioinformática (DNASTAR, Inc., Madison, WI), usando parámetros por defecto. Este programa realiza varios esquemas de alineación descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. En Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC vol. 5, supl. 3, págs. 345-358; Hein J., Unified Approach to Alignment and Phylogenies, págs. 626-645 (1990); Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. y Sharp, P.M., CABIOS 5:151-153 (1989); Myers, E.W. y Muller W., CABIOS 4:11-17 (1988); Robinson, E.D., Comb. Theor 11:105 (1971); Santou, N. Nes, M., Mol. Biol. Evol. 4:406-425 (1987); Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R., Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA (1973); Wilbur, W.J. y Lipman, D.J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730 (1983).

Alternativamente, la alineación óptima de secuencias para comparación puede realizarse mediante el algoritmo de identidad local de Smith y Waterman, Add. APL. Math 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de identidad de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante los métodos de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección.

Un ejemplo preferido de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.*, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402 (1977), y Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990), respectivamente. BLAST y BLAST 2.0 pueden usarse, por ejemplo con los parámetros descritos en el presente documento, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia entre dos o más de los polinucleótidos. El software para realizar los análisis de BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information. En un ejemplo ilustrativo, pueden calcularse puntuaciones acumuladas usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre >0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes; siempre <0). La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulada desciende en la cantidad X con respecto a su valor logrado máximo; la puntuación acumulada llega a cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, y una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)), alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas hebras.

En determinadas realizaciones, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias alineadas de manera óptima a lo largo de una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, en la que la porción de la secuencia de polinucleótido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) del 20 por ciento o menos, habitualmente del 5 al 15 por ciento, o del 10 al 12 por ciento, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que aparecen bases de ácido nucleico idénticas en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando los resultados por 100 para producir el porcentaje de identidad de

secuencia.

Los expertos habituales en la técnica apreciarán que, como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican para un anticuerpo tal como se describe en el presente documento. Algunos de estos polinucleótidos soportan una identidad de secuencia mínima con la secuencia de nucleótidos de la secuencia de polinucleótido original o nativa que codifica para anticuerpos que se unen a CD40. No obstante, la presente divulgación contempla expresamente polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso de codones. En determinadas realizaciones, se contemplan específicamente secuencias que tienen codones optimizados para su expresión en mamíferos.

Por tanto, en otra realización de la invención, puede emplearse un enfoque de mutagénesis, tal como mutagénesis específica de sitio, para la preparación de variantes y/o derivados de los anticuerpos descritos en el presente documento. Mediante este enfoque, pueden hacerse modificaciones específicas en una secuencia de polipéptido a través de mutagénesis de los polinucleótidos subyacentes que la codifican. Estas técnicas proporcionan un enfoque sencillo para preparar y someter a prueba variantes de secuencia, por ejemplo, que incorporan una o más de las consideraciones anteriores, introduciendo uno o más cambios en la secuencia de nucleótidos en el polinucleótido.

La mutagénesis específica de sitio permite la producción de mutantes a través del uso de secuencias de oligonucleótido específicas que codifican para la secuencia de ADN de la mutación deseada, así como un número suficiente de nucleótidos adyacentes, para proporcionar una secuencia de cebador de tamaño y complejidad de secuencia suficientes para formar un dúplex estable en ambos lados de la unión de delección que está atravesándose. Pueden emplearse mutaciones en una secuencia de polinucleótido seleccionada para mejorar, alterar, disminuir, modificar o cambiar de otra forma las propiedades del propio polinucleótido, y/o alterar las propiedades, actividad, composición, estabilidad o secuencia primaria del polipéptido codificado.

En determinadas realizaciones, los inventores contemplan la mutagénesis de las secuencias de polinucleótido que codifican para un anticuerpo dado a conocer en el presente documento, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, para alterar una o más propiedades del polipéptido codificado, tal como la afinidad de unión del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo, o la función de una región Fc particular, o la afinidad de la región Fc por un FcγR particular. Las técnicas de mutagénesis específica de sitio se conocen bien en la técnica, y se usan ampliamente para crear variantes de tanto polipéptidos como polinucleótidos. Por ejemplo, se usa a menudo mutagénesis específica de sitio para alterar una porción específica de una molécula de ADN. En tales realizaciones, se emplea un cebador que comprende normalmente de aproximadamente 14 a aproximadamente 25 nucleótidos o así de longitud, alterándose de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 residuos en ambos lados de la unión de la secuencia.

Tal como apreciarán los expertos en la técnica, las técnicas de mutagénesis específica de sitio han empleado a menudo un vector de fago que existe en forma tanto monocatenaria como bicatenaria. Los vectores típicos útiles en mutagénesis dirigida al sitio incluyen vectores tales como el fago M13. Estos fagos están fácilmente disponibles comercialmente y su uso lo conocen bien generalmente los expertos en la técnica. También se emplean de manera rutinaria plásmidos bicatenarios en mutagénesis dirigida al sitio que eliminan la etapa de transferir el gen de interés de un plásmido a un fago.

En general, la mutagénesis dirigida al sitio según el presente documento se realiza obteniendo en primer lugar un vector monocatenario o separando por fusión las dos hebras de un vector bicatenario que incluye dentro de su secuencia una secuencia de ADN que codifica para el péptido deseado. Se prepara un cebador de oligonucleótido que lleva la secuencia mutada deseada, generalmente de manera sintética. Este cebador se aparea entonces con el vector monocatenario y se somete a enzimas que polimerizan el ADN tales como fragmento Klenow de polimerasa I de *E. coli*, con el fin de completar la síntesis de la hebra que lleva la mutación. Por tanto, se forma un heterodúplex en el que una hebra codifica para la secuencia no mutada original y la segunda hebra lleva la mutación deseada. Este vector de heterodúplex se usa entonces para transformar células apropiadas, tales como células de *E. coli*, y se seleccionan clones que incluyen vectores recombinantes que llevan la disposición de secuencia mutada.

La preparación de variantes de secuencia de los segmentos de ADN que codifican para péptidos seleccionados usando mutagénesis dirigida al sitio proporciona medios de producción de especies potencialmente útiles y no se pretende que sea limitativo puesto que hay otros modos en los que pueden obtenerse variantes de secuencia de péptidos y las secuencias de ADN que codifican para los mismos. Por ejemplo, pueden tratarse vectores recombinantes que codifican para la secuencia de péptidos deseada con agentes mutagénicos, tales como hidroxilamina, para obtener variantes de secuencia. Se encuentran detalles específicos respecto a estos métodos y protocolos en las enseñanzas de Maloy *et al.*, 1994; Segal, 1976; Prokop y Bajpai, 1991; Kuby, 1994; y Maniatis *et al.*, 1982.

Tal como se usa en el presente documento, el término "procedimiento de mutagénesis dirigida a oligonucleótidos" se refiere a procesos dependientes del molde y propagación mediada por vector que dan como resultado un aumento en la concentración de una molécula de ácido nucleico específica en relación con su concentración inicial, o en un aumento en la concentración de una señal detectable, tal como amplificación. Tal como se usa en el presente documento, el término "procedimiento de mutagénesis dirigida a oligonucleótidos" se pretende que se refiera a un

proceso que implica la extensión dependiente del molde de una molécula cebadora. El término proceso dependiente del molde se refiere a síntesis de ácidos nucleicos de una molécula de ARN o ADN en la que la secuencia de la hebra recién sintetizada de ácido nucleico está dictada por las normas bien conocidas de apareamiento de bases complementaria (véase, por ejemplo, Watson, 1987). Normalmente, las metodologías mediadas por vector implican la introducción del fragmento de ácido nucleico en un vector de ADN o ARN, la amplificación clonal del vector, y la recuperación del fragmento amplificado de ácido nucleico. Se proporcionan ejemplos de tales metodologías en la patente estadounidense n.º 4.237.224.

En otro enfoque para la producción de variantes de polipéptido, puede emplearse recombinación de secuencia recurrente, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.837.458. En este enfoque, se realizan ciclos iterativos de recombinación y cribado o selección para “desarrollar” variantes de polinucleótido individuales que tienen, por ejemplo, afinidad de unión aumentada. Determinadas realizaciones también proporcionan constructos en forma de plásmidos, vectores, casetes de expresión o transcripción que comprenden al menos un polinucleótido tal como se describe en el presente documento.

En muchas realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican para un anticuerpo monoclonal objeto se introducen directamente en una célula huésped, y la célula incubada en condiciones suficientes para inducir expresión del anticuerpo codificado. Los anticuerpos de esta divulgación se preparan usando técnicas convencionales bien conocidas para los expertos en la técnica en combinación con las secuencias de ácido nucleico y de polipéptido proporcionadas en el presente documento. Las secuencias de polipéptido pueden usarse para determinar secuencias de ácido nucleico apropiadas que codifican para el anticuerpo particular dadas a conocer de ese modo. La secuencia de ácido nucleico puede optimizarse para reflejar “preferencias” de codón particulares para diversos sistemas de expresión según métodos convencionales bien conocidos para los expertos en la técnica.

Según determinadas realizaciones relacionadas, se proporciona una célula huésped recombinante que comprende uno o más constructos tal como se describe en el presente documento; un ácido nucleico que codifica para cualquier anticuerpo, CDR, dominio VH o VL, o fragmento de unión a antígeno del mismo; y un método de producción del producto codificado, método que comprende por tanto expresión de ácido nucleico codificante. La expresión puede lograrse de manera conveniente cultivando en condiciones apropiadas células huésped recombinantes que contienen el ácido nucleico. Tras la producción mediante expresión, puede aislarse un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, y/o purificarse usando cualquier técnica adecuada, y entonces se usan según se deseen.

Pueden aislarse y/o purificarse anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos tal como se proporciona en el presente documento, y moléculas y vectores de ácidos nucleicos codificantes, por ejemplo a partir de su medio natural, en forma sustancialmente pura u homogénea, o, en el caso de ácido nucleico, libre o sustancialmente libre de ácido nucleico o genes de origen distinto a la secuencia que codifica para un polipéptido con la función deseada. Ácido nucleico puede comprender ADN o ARN y puede ser completa o parcialmente sintético. La referencia a una secuencia de nucleótidos tal como se expone en el presente documento abarca una molécula de ADN con la secuencia especificada, y abarca una molécula de ARN con la secuencia especificada en la que U se sustituye por T, a menos que el contexto requiera lo contrario.

Se conocen bien sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de diferentes células huésped. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, levadura y sistemas de baculovirus. Las líneas de células de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de hámster bebé, células de melanoma de ratón NSO y muchas otras. Un huésped bacteriano preferido común es *E. coli*.

La expresión de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno en células procariotas tales como *E. coli* está bien establecida en la técnica. Para una revisión, véase, por ejemplo Pluckthun, A. *Bio/Technology* 9: 545-551 (1991). La expresión en células eucariotas en cultivo también está disponible para los expertos en la técnica como una opción para la producción de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, véanse revisiones recientes, por ejemplo Ref, M. E. (1993) *Curr. Opinion Biotech.* 4: 573-576; Trill J. J. *et al.* (1995) *Curr. Opinion Biotech* 6: 553-560.

También pueden escogerse o construirse vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos, virales por ejemplo fago, o fagémido, según sea apropiado. Para detalles adicionales véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 2ª edición, Sambrook *et al.*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo en la preparación de constructos de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen en detalle en *Current Protocols in Molecular Biology*, segunda edición, Ausubel *et al.* eds., John Wiley & Sons, 1992, o posteriores actualizaciones de los mismos.

El término “célula huésped” se usa para referirse a una célula en la que se ha introducido, o que puede haberse introducido en, una secuencia de ácido nucleico que codifica para uno o más de los anticuerpos descritos en el presente documento, y que expresa adicionalmente o puede expresar un gen seleccionado de interés, tal como un

gen que codificara para cualquier anticuerpo descrito en el presente documento. El término incluye la progenie de la célula original, ya sea o no la progenie idéntica en morfología o en maquillaje genético al progenitor original, siempre que esté presente el gen seleccionado. Por consiguiente, también se contempla un método que comprende introducir tal ácido nucleico en una célula huésped. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección de fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción usando retrovirus u otros virus, por ejemplo vaccinia o, para células de insecto, baculovirus. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación de cloruro de calcio, electroporación y transfección usando bacteriófago. La introducción puede continuarse provocando o permitiendo la expresión del ácido nucleico, por ejemplo, cultivando células huésped en condiciones para la expresión del gen. En una realización, el ácido nucleico se integra en el genoma (por ejemplo cromosoma) de la célula huésped. Puede promoverse la integración mediante inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, según técnicas convencionales.

La presente invención también proporciona, en determinadas realizaciones, un método que comprende usar un constructo tal como se indicó anteriormente en un sistema de expresión con el fin de expresar un polipéptido particular tal como un anticuerpo específico de CD40 tal como se describe en el presente documento. El término "transducción" se usa para referirse a la transferencia de genes de una bacteria a otra, habitualmente mediante un fago. "Transducción" también se refiere a la adquisición y transferencia de secuencias celulares eucariotas mediante retrovirus. El término "transfección" se usa para referirse a la captación de ADN foráneo o exógeno por una célula, y una célula se ha "transfectado" cuando el ADN exógeno se ha introducido dentro de la membrana celular. Varias técnicas de transfección se conocen bien en la técnica y se dan a conocer en el presente documento. Véase, por ejemplo, Graham *et al.*, 1973, *Virology* 52:456; Sambrook *et al.*, 2001, *MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratories; Davis *et al.*, 1986, *BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, Elsevier; y Chu *et al.*, 1981, *Gene* 13:197. Tales técnicas pueden usarse para introducir uno o más restos de ADN exógeno en células huésped adecuadas.

El término "transformación" tal como se usa en el presente documento se refiere a un cambio en las características genéticas de una célula, y una célula se ha transformado cuando se ha modificado para contener un ADN nuevo. Por ejemplo, una célula se transforma cuando se modifica genéticamente a partir de su estado nativo. Tras la transfección o transducción, el ADN transformante puede recombinarse con el de la célula integrándose físicamente en un cromosoma de la célula, o puede mantenerse de manera transitoria como elemento episomal sin replicarse, o puede replicarse independientemente como un plásmido. Una célula se considera que se ha transformado de manera estable cuando el ADN se replica con la división de la célula. El término "que se produce de manera natural" o "nativo" cuando se usa en relación con materiales biológicos tales como moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, células huésped, y similares, se refiere a materiales que se encuentran en la naturaleza y no son manipulados por un ser humano. De manera similar, "que no se produce de manera natural" o "no nativo" tal como se usa en el presente documento se refiere a un material que no se encuentra en la naturaleza o que se ha modificado o sintetizado estructuralmente por un ser humano.

Los términos "polipéptido" "proteína" y "péptido" y "glicoproteína" se usan de manera intercambiable y significan un polímero de aminoácidos no limitados a ninguna longitud particular. El término no excluye modificaciones tales como miristilación, sulfación, glicosilación, fosforilación y adición o delección de secuencias señal. Los términos "polipéptido" o "proteína" significan una o más cadenas de aminoácidos, en las que cada cadena comprende aminoácidos unidos de manera covalente mediante enlaces peptídicos, y en las que dicho polipéptido o proteína puede comprender una pluralidad de cadenas unidas de manera covalente o no covalente mediante enlaces peptídicos, que tienen la secuencia de proteínas nativas, es decir, proteínas producidas por células que se producen de manera natural y específicamente no recombinantes, o células modificadas por ingeniería genética o recombinantes, y comprenden moléculas que tienen la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa, o moléculas que tienen delecciones de, adiciones a, y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de la secuencia nativa. Los términos "polipéptido" y "proteína" abarcan específicamente los anticuerpos que se unen a CD40 de la presente divulgación, o secuencias que tienen delecciones de, adiciones a, y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de un anticuerpo anti-CD40. Por tanto, un "polipéptido" o una "proteína" puede comprender una (denominado "un monómero") o una pluralidad (denominado "un multímero") de cadenas de aminoácido.

El término "proteína aislada" al que se hace referencia en el presente documento significa que una proteína objeto (1) está libre de al menos algunas otras proteínas con las que se encontraría normalmente en la naturaleza, (2) está esencialmente libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, de la misma especie, (3) se expresa una célula de una especie diferente, (4) se ha separado de al menos aproximadamente el 50 por ciento de polinucleótidos, lípidos, hidratos de carbono, u otros materiales con los que se asocia en la naturaleza, (5) no se asocia (mediante interacción covalente o no covalente) con porciones de una proteína con la que la "proteína aislada" se asocia en la naturaleza, (6) se asocia operativamente (mediante interacción covalente o no covalente) con un polipéptido con el que no se asocia en la naturaleza, o (7) no se produce en la naturaleza. Una proteína aislada de este tipo puede codificarse por ADN, ADNc, ARNm u otro ARN genómico, de quizás origen sintético, o cualquier combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, la proteína aislada está sustancialmente libre de proteínas o polipéptidos u otros contaminantes que se encuentran en su medio natural que interferirían con su uso (terapéutico, diagnóstico, profiláctico, de investigación u otro).

El término "fragmento de polipéptido" se refiere a un polipéptido, que puede ser monomérico o multimérico, que tiene una deleción amino terminal, una deleción carboxilo terminal, y/o una deleción o sustitución interna de un polipéptido que se produce de manera natural o producido de manera recombinante. En determinadas realizaciones, un fragmento de polipéptido puede comprender una cadena de aminoácidos de al menos 5 a aproximadamente 500 aminoácidos de longitud. Se apreciará que en determinadas realizaciones, los fragmentos son de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 ó 450 aminoácidos de longitud. Los fragmentos particularmente útiles de polipéptido incluyen dominios funcionales, incluyendo dominios de unión a antígeno o fragmentos de anticuerpos. En el caso de un anticuerpo anti-CD40, los fragmentos útiles incluyen, pero no se limitan a: una región CDR, especialmente una región CDR3 de la cadena pesada o ligera; una región variable de una cadena pesada o ligera; una porción de una cadena de anticuerpo o sólo su región variable incluyendo dos CDR; y similares.

Los polipéptidos pueden comprender una secuencia señal (o líder) en el extremo N-terminal de la proteína, que dirige de manera cotraduccional o postraduccional la transferencia de la proteína. Cualquier secuencia de polipéptido de aminoácidos proporcionada en el presente documento que incluye un péptido señal se contempla también para cualquier uso descrito en el presente documento sin un péptido señal o líder. Tal como reconocería el experto, el péptido señal se escinde habitualmente durante el procesamiento y no está incluido en la proteína de anticuerpo activo. El polipéptido también puede fusionarse en marco o conjugarse con un ligador u otra secuencia para facilidad de síntesis, purificación o identificación del polipéptido (por ejemplo, poli-His), o para potenciar la unión del polipéptido a un soporte sólido.

También puede emplearse una secuencia ligadora/espaciadora de péptidos para separar múltiples componentes de polipéptido por una distancia suficiente para garantizar que cada polipéptido se repliega en sus estructuras secundarias y/o terciarias, si se desea. Puede incorporarse una secuencia ligadora de péptidos en un polipéptido de fusión usando técnicas convencionales bien conocidas en la técnica.

Determinadas secuencias espaciadoras de péptidos pueden escogerse, por ejemplo, basándose en: (1) su capacidad para adoptar una conformación ampliada flexible; (2) su incapacidad de adoptar una estructura secundaria que podría interactuar con epítomos funcionales en los polipéptidos primero y segundo; y/o (3) la carencia de residuos hidrófobos o cargados que podrían reaccionar con los epítomos funcionales de polipéptido.

En una realización ilustrativa, las secuencias espaciadoras de péptidos contienen, por ejemplo, residuos de Gly, Asn y Ser. También pueden incluir otros aminoácidos neutros próximos, tales como Thr y Ala, en la secuencia espaciadora.

Otras secuencias de aminoácidos que pueden emplearse de manera útil como espaciadores incluyen las dadas a conocer en Maratea *et al.*, Gene 40:39 46 (1985); Murphy *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258 8262 (1986); patente estadounidense n.º 4.935.233 y la patente estadounidense n.º 4.751.180.

Otros espaciadores ilustrativos pueden incluir, por ejemplo, Glu-Gly-Lys-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Glu-Ser-Lys-Val-Asp (Chaudhary *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:1066-1070) y Lys-Glu-Ser-Gly-Ser-Val-Ser-Ser-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Phe-Arg-Ser-Leu-Asp (Bird *et al.*, 1988, Science 242:423-426).

En algunas realizaciones, no se requieren secuencias espaciadoras cuando los polipéptidos primero y segundo tienen regiones de aminoácido N-terminales no esenciales que pueden usarse para separar los dominios funcionales y evitar interferencia estérica. Pueden fusionarse dos secuencias codificantes directamente sin ningún espaciador o usando un poliligador flexible que se compone, por ejemplo, del pentámero Gly-Gly-Gly-Gly-Ser repetido de 1 a 3 veces. Un espaciador de este tipo se ha usado en la construcción de anticuerpos de cadenas sencillas (scFv) mediante inserción entre VH y VL (Bird *et al.*, 1988, Science 242:423-426; Huston *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5979-5883).

Un espaciador peptídico, en determinadas realizaciones, está diseñado para permitir la correcta interacción entre dos láminas beta que forman la región variable del anticuerpo de cadenas sencillas.

En determinadas realizaciones ilustrativas, un espaciador peptídico está entre 1 y 5 aminoácidos, entre 5 y 10 aminoácidos, entre 5 y 25 aminoácidos, entre 5 y 50 aminoácidos, entre 10 y 25 aminoácidos, entre 10 y 50 aminoácidos, entre 10 y 100 aminoácidos, o cualquier intervalo intermedio de aminoácidos.

En otras realizaciones ilustrativas, un espaciador peptídico comprende de aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más aminoácidos de longitud.

Se contempla(n) modificación/modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Por ejemplo, pueden prepararse variantes de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo introduciendo cambios de nucleótido apropiados en un polinucleótido que codifica para el anticuerpo, o una cadena de los mismos, o mediante síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier

combinación de delección, inserción y sustitución puede realizarse para llegar al anticuerpo final, siempre que el constructo final presente las características deseadas (por ejemplo, unión de alta afinidad a CD40). Los cambios de aminoácido también pueden alterar procesos postraduccionales del anticuerpo, tal como cambiando el número o la posición de sitios de glicosilación. Cualquiera de las variaciones y modificaciones descritas anteriormente para los polipéptidos de la presente invención pueden incluirse en anticuerpos de la presente invención.

La presente divulgación proporciona variantes de los anticuerpos dados a conocer en el presente documento. En determinadas realizaciones, tales anticuerpos variantes o fragmentos de unión a antígeno, o CDR de los mismos, se unen a CD40 al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 70%, y en determinadas realizaciones, al menos aproximadamente el 90% así como una secuencia de anticuerpo específicamente expuesta en el presente documento. En realizaciones adicionales, tales anticuerpos variantes o fragmentos de unión a antígeno, o CDR de los mismos, se unen a CD40 con mayor afinidad que los anticuerpos expuestos en el presente documento, por ejemplo, que se unen de manera cuantitativa al menos aproximadamente el 105%, el 106%, el 107%, el 108%, el 109%, o el 110% así como una secuencia de anticuerpo específicamente expuesta en el presente documento.

En realizaciones particulares, un anticuerpo objeto puede tener: a) una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80% idéntica, al menos el 95% idéntica, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 98% o el 99% idéntica, a la región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD40 descrito en el presente documento; y b) una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80% idéntica, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 98% o el 99% idéntica, a la región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-CD40 descrito en el presente documento. La secuencia de aminoácidos de regiones de cadena pesada y ligera ilustrativas se exponen en SEQ ID NO: 1-56.

En realizaciones particulares, el anticuerpo puede comprender: a) una región variable de cadena pesada que comprende: i. una región CDR1 que es idéntica en secuencia de aminoácidos a la región CDR1 de cadena pesada de un anticuerpo seleccionado descrito en el presente documento; ii. una región CDR2 que es idéntica en secuencia de aminoácidos a la región CDR2 de cadena pesada del anticuerpo seleccionado; y iii. una región CDR3 que es idéntica en secuencia de aminoácidos a la región de cadena pesada CDR3 del anticuerpo seleccionado; y b) un dominio variable de cadena ligera que comprende: i. una región CDR1 que es idéntica en secuencia de aminoácidos a la región CDR1 de cadena ligera del anticuerpo seleccionado; ii. una región CDR2 que es idéntica en secuencia de aminoácidos a la región CDR2 de cadena ligera del anticuerpo seleccionado; y iii. una región CDR3 que es idéntica en secuencia de aminoácidos a la región CDR3 de cadena ligera del anticuerpo seleccionado; en el que el anticuerpo se une específicamente a una diana seleccionada (por ejemplo, CD40). En una realización adicional, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, es un anticuerpo variante en el que la variante comprende una cadena pesada y ligera idéntica al anticuerpo seleccionado excepto por hasta 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o más sustituciones de aminoácido en las regiones de CDR de las regiones VH y VL. En este aspecto, puede haber 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o en determinadas realizaciones, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 más sustituciones de aminoácido en las regiones de CDR del anticuerpo seleccionado. Las sustituciones pueden ser en CDR o bien en las regiones VH y/o bien VL. (Véase, por ejemplo, Muller, 1998, Structure 6:1153-1167).

La determinación de las estructuras tridimensionales de polipéptidos representativos (por ejemplo, anticuerpos específicos de CD40 variantes tal como se proporciona en el presente documento, por ejemplo, una proteína de anticuerpo que tiene un fragmento de unión a antígeno tal como se proporciona en el presente documento) puede realizarse mediante metodologías de rutina tales como sustitución, adición, delección o inserción de uno o más aminoácidos con aminoácidos naturales o no naturales seleccionados puede modelarse prácticamente con fines de determinar si una variante estructural derivada retiene las propiedades de llenado del espacio de las especies dadas a conocer por la presente. Véase, por ejemplo, Donate *et al.*, 1994 Prot. Sci. 3:2378; Bradley *et al.*, Science 309: 1868-1871 (2005); Schueler-Furman *et al.*, Science 310:638 (2005); Dietz *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 103:1244 (2006); Dodson *et al.*, Nature 450:176 (2007); Qian *et al.*, Nature 450:259 (2007); Raman *et al.* Science 327:1014-1018 (2010). Algunos ejemplos adicionales no limitativos de algoritmos informáticos que pueden usarse para estas y realizaciones relacionadas, tales como para diseño racional de anticuerpos específicos de CD40, dominios de unión a antígeno de los mismos tal como se proporciona en el presente documento, incluyen VMD que es un programa de visualización molecular para presentar, animar y analizar grandes sistemas biomoleculares usando gráficos en 3-D y encriptación incorporada (véase la página web para el Theoretical and Computational Biophysics Group, Universidad de Illinois en Urbana-Champaign, en ks.uiuc.edu/Research/vmd/). Se conocen muchos otros programas informáticos en la técnica y están disponibles para el experto, y que permiten determinar dimensiones atómicas a partir de modelos de relleno de espacios (radios de van der Waals) de conformaciones de energía minimizada; GRID, que busca determinar regiones de alta afinidad para diferentes grupos químicos, potenciando de ese modo la unión, búsquedas de Monte Carlo, que calculan el alineamiento matemático, y CHARMM (Brooks *et al.* (1983) J. Comput. Chem. 4:187-217) y AMBER (Weiner *et al.* (1981) J. Comput. Chem. 106: 765), que valora los cálculos de campo de fuerza, y análisis (véase también, Eisenfield *et al.* (1991) Am. J. Physiol. 261:C376-386; Lybrand (1991) J. Pharm. Belg. 46:49-54; Froimowitz (1990) Biotechniques 8:640-644; Burbam *et al.* (1990) Proteins 7:99-111; Pedersen (1985) Environ. Health Perspect. 61:185-190; y Kini *et al.* (1991) J. Biomol. Struct. Dyn. 9:475-488). Una variedad de programas informáticos computacionales apropiados también están comercialmente disponibles, tal como de Schrödinger (Munich, Alemania).

En otra realización de invención, los anticuerpos anti-CD40 y versiones humanizadas de los mismos se derivan de anticuerpos monoclonales de conejo, y en particular se generan usando tecnología RabMab®. Estos anticuerpos son ventajosos puesto que requieren mínimas modificaciones de secuencia, facilitando de ese modo la retención de propiedades funcionales tras la humanización usando tecnología de humanización guiada por linaje mutacional (MLG) (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 7.462.697). Por tanto, los métodos ilustrativos para elaborar los anticuerpos anti-CD40 de la presente divulgación incluyen la tecnología de anticuerpo monoclonal de conejo RabMab® descrita, por ejemplo, en las patentes estadounidenses 5.675.063 y 7.429.487. En este aspecto, en determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD40 de la divulgación se producen en conejos. En realizaciones particulares, se usa un linfocito B inmortal derivado de conejo que puede fusionarse con un esplenocito de conejo para producir una célula híbrida que produce un anticuerpo. El linfocito B inmortal no expresa de manera detectable cadena pesada de inmunoglobulina endógena y puede contener, en determinadas realizaciones, un gen que codifica para la cadena pesada de inmunoglobulina alterado.

Composiciones y métodos de uso

La presente divulgación proporciona composiciones que comprenden los anticuerpos específicos de CD40, fragmentos de unión a antígeno de los mismos y administración de tal composición en una variedad de entornos terapéuticos.

La administración de los anticuerpos específicos de CD40 descrita en el presente documento, en forma pura o en una composición farmacéutica apropiada, puede llevarse a cabo por medio de cualquiera de los modos aceptados de administración de agentes para servir utilidades similares. Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse combinando un anticuerpo o composición que contiene anticuerpo con un portador, diluyente o excipiente fisiológicamente aceptable apropiado, y puede formularse en preparaciones en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, disoluciones, supositorios, inyecciones, inhalatorios, geles, microesferas y aerosoles. Además, otros principios farmacéuticamente activos (incluyendo otros agentes anticancerosos tal como se describe en cualquier otra parte en el presente documento) y/o excipientes adecuados tales como sales, tampones y estabilizadores pueden, pero no necesariamente, estar presentes dentro de la composición. La administración puede lograrse mediante una variedad de diferentes vías, incluyendo oral, parenteral, nasal, intravenosa, intradérmica, subcutánea o tópica. Los modos preferidos de administración dependen de la naturaleza del estado que va a tratarse o prevenirse. Una cantidad que, tras la administración, reduce, inhibe, previene o retrasa el avance y/o metástasis de un cáncer se considera eficaz.

En determinadas realizaciones, la cantidad administrada es suficiente para dar como resultado remisión tumoral, tal como se indica mediante una disminución estadísticamente significativa en la cantidad de tumor viable, por ejemplo, al menos un 50% de disminución en la masa tumoral, o mediante dimensiones de barrido alteradas (por ejemplo, disminuidas con significación estadística). En otras realizaciones, la cantidad administrada es suficiente para dar como resultado una reducción clínicamente relevante de los síntomas de un indicio de enfermedad particular conocido para el médico experto.

La dosificación y duración de tratamiento precisas es una función de la enfermedad que está tratándose y puede determinarse empíricamente usando protocolos de pruebas conocidos o sometiendo a prueba las composiciones en sistemas de modelo conocidos en la técnica y extrapolarlos de ahí. También pueden realizarse ensayos clínicos controlados. Las dosificaciones también pueden variar con la gravedad del estado que va a aliviarse. Una composición farmacéutica se formula generalmente y se administra para ejercer un efecto terapéuticamente útil mientras se minimizan efectos secundarios no deseables. La composición puede administrarse una vez, o puede dividirse en un número de dosis más pequeñas que van a administrarse a intervalos de tiempo. Para cualquier sujeto particular, pueden ajustarse pautas posológicas específicas a lo largo del tiempo según la necesidad individual.

Las composiciones que contienen anticuerpo específico de CD40 pueden administrarse solas o en combinación con otros tratamientos contra el cáncer conocidos, tales como radioterapia, quimioterapia, trasplante, inmunoterapia, terapia hormonal, terapia fotodinámica, etc. Las composiciones también pueden administrarse en combinación con antibióticos.

Por tanto, las vías típicas de administración de estas y composiciones farmacéuticas relacionadas incluyen, sin limitación, oral, tópica, transdérmica, inhalación, parenteral, sublingual, bucal, rectal, vaginal e intranasal. El término parenteral tal como se usa en el presente documento incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intraesternal o técnicas de infusión. Composiciones farmacéuticas según determinadas realizaciones de la presente invención se formulan para permitir que los principios activos contenidos en las mismas estén biodisponibles tras administración de la composición a un paciente. Las composiciones que se administrarán a un sujeto o paciente pueden tomar la forma de una o más unidades de dosificación, donde por ejemplo, un comprimido puede ser una unidad de dosificación individual, y un recipiente de un anticuerpo específico de CD40 descrito en el presente documento en forma de aerosol puede mantener una pluralidad de unidades de dosificación. Los métodos reales de preparación de tales formas de dosificación los conocen, o serán evidentes, para los expertos en esta técnica; por ejemplo, véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000). La composición que va a administrarse contendrá, en cualquier caso, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la presente divulgación, para el tratamiento de una enfermedad o

estado de interés según las enseñanzas en el presente documento.

Una composición farmacéutica puede estar en forma de un sólido o líquido. En una realización, el/los portador(es) está(n) particulado(s), de modo que las composiciones están, por ejemplo, en forma de comprimido o polvo. El/los portador(es) puede(n) ser líquido(s), siendo las composiciones, por ejemplo, un aceite oral, líquido inyectable o un aerosol, que es útil en, por ejemplo, la administración inhaladora. Cuando se pretende para administración oral, la composición farmacéutica está preferiblemente o bien en forma sólida o bien líquida, donde se incluyen formas semisólidas, semilíquidas, de suspensión y gel dentro de las formas consideradas en el presente documento como o bien sólidas o bien líquidas.

Como composición sólida para administración oral, la composición farmacéutica puede formularse en un polvo, gránulo, comprimido, píldora, cápsula, chicle, oblea o similares. Una composición sólida de este tipo contendrá normalmente uno o más diluyentes inertes o portadores comestibles. Además, pueden estar presentes uno o más de los siguientes: aglutinantes tales como carboximetilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; excipientes tales como almidón, lactosa o dextrinas, agentes disgregantes tales como ácido algínico, alginato de sodio, Primogel, almidón de maíz y similares; lubricantes tales como estearato de magnesio o Sterotex; deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; un agente saborizante tal como menta piperita, salicilato de metilo o sabor a naranja; y un agente colorante. Cuando la composición farmacéutica está en forma de una cápsula, por ejemplo, una cápsula de gelatina, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un portador líquido tal como polietilenglicol o aceite.

La composición farmacéutica puede estar en forma de un líquido, por ejemplo, un elixir, jarabe, disolución, emulsión o suspensión. El líquido puede ser para administración oral o para administración mediante inyección, como dos ejemplos. Cuando se pretende para administración oral, la composición preferida contiene, además de los compuestos presentes, uno o más de un agente edulcorante, conservantes, tinte/colorante y potenciador del sabor. En una composición destinada a administrarse mediante inyección, pueden incluirse uno o más de un tensioactivo, conservante, agente humectante, agente de dispersión, agente de suspensión, tampón, estabilizador y agente isotónico.

Las composiciones farmacéuticas líquidas, ya sean disoluciones, suspensiones u otra forma similar, pueden incluir uno o más de los siguientes adyuvantes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, disolución salina, preferiblemente solución salina fisiológica, disolución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos tales como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como medio de disolvente o suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabeno; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de tonicidad tal como cloruro de sodio o dextrosa. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o múltiples viales de dosis hechos de vidrio o plástico. La solución salina fisiológica es un adyuvante preferido. Una composición farmacéutica inyectable es preferiblemente estéril.

Una composición farmacéutica líquida destinada para o bien administración parenteral o bien oral debe contener una cantidad de un anticuerpo específico de CD40 como se da a conocer en el presente documento de modo que se obtendrá una dosificación adecuada. Normalmente, esta cantidad es al menos el 0,01% del anticuerpo en la composición. Cuando se destina para administración oral, esta cantidad puede variarse para ser de entre el 0,1 y aproximadamente el 70% del peso de la composición. Determinadas composiciones farmacéuticas orales contienen entre aproximadamente el 4% y aproximadamente el 75% del anticuerpo. En determinadas realizaciones, se preparan composiciones farmacéuticas y preparaciones según la presente invención de modo que una unidad de dosificación parenteral contiene entre el 0,01 y el 10% en peso del anticuerpo antes de dilución.

La composición farmacéutica puede destinarse para administración tópica, en cuyo caso el portador puede comprender adecuadamente una disolución, emulsión, pomada o base de gel. La base, por ejemplo, puede comprender uno o más de los siguientes: petrolato, lanolina, polietilenglicoles, cera de abeja, aceite mineral, diluyentes tales como agua y alcohol, y emulsionantes y estabilizadores. Pueden estar presentes agentes espesantes en una composición farmacéutica para administración tópica. Si se destina para administración transdérmica, la composición puede incluir un parche transdérmico o dispositivo de iontoforesis. La composición farmacéutica puede destinarse para administración rectal, en forma, por ejemplo, de un supositorio, que se fundirá en el recto y liberará el fármaco. La composición para administración rectal puede contener una base oleaginosa como excipiente no irritante adecuado. Tales bases incluyen, sin limitación, lanolina, manteca de cacao y polietilenglicol.

La composición farmacéutica puede incluir diversos materiales, que modifican la forma física de una unidad de dosificación sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que forman una vaina de recubrimiento alrededor de los principios activos. Los materiales que forman la vaina de recubrimiento son normalmente inertes, y pueden seleccionarse de, por ejemplo, azúcar, goma laca, y otros agentes de recubrimiento entérico. Alternativamente, los principios activos pueden atraparse en una cápsula de gelatina. La composición farmacéutica en forma sólida o líquida puede incluir un agente que se une al anticuerpo de la invención y de ese modo, ayuda en la administración del compuesto. Los agentes adecuados que pueden actuar en esta capacidad

incluyen otros anticuerpos monoclonales o policlonales, una o más proteínas o un liposoma. La composición farmacéutica puede consistir esencialmente en unidades de dosificación que pueden administrarse como aerosol. El término aerosol se usa para denotar una variedad de sistemas que varían entre aquellos de naturaleza y sistemas que consisten en paquetes presurizados. La administración puede ser mediante un gas licuado o comprimido o mediante un sistema de bomba adecuado que dispensa los principios activos. Los aerosoles pueden administrarse en sistemas de una fase, bifásicos o trifásicos con el fin de administrar el/los principio(s) activo(s). La administración del aerosol incluye el recipiente, activadores, válvulas, subrecipientes y similares necesarios, que juntos pueden formar un kit. Un experto habitual en la técnica, sin experimentación indebida, puede determinar aerosoles preferidos.

Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse mediante metodología bien conocida en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, una composición farmacéutica destinada a administrarse por inyección puede prepararse combinando una composición que comprende un anticuerpo específico de CD40 tal como se describe en el presente documento y opcionalmente, una o más de sales, tampones y/o estabilizadores, con agua destilada, estéril para formar una disolución. Puede añadirse un tensioactivo para facilitar la formación de una disolución o suspensión homogénea. Los tensioactivos son compuestos que interactúan de manera no covalente con la composición de anticuerpo para facilitar la disolución o suspensión homogénea del anticuerpo en el sistema de administración acuoso.

Las composiciones pueden administrarse en una cantidad terapéuticamente eficaz, que variará según una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico (por ejemplo, anticuerpo específico de CD40) empleado; la estabilidad metabólica y la duración de acción del compuesto; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el modo y el tiempo de administración; la tasa de excreción; la combinación de fármaco; la gravedad del trastorno o estado particular; y que el sujeto se someta a terapia. Generalmente, una dosis diaria terapéuticamente eficaz es (para un mamífero de 70 kg) de desde aproximadamente 0,001 mg/kg (es decir, 0,07 mg) hasta aproximadamente 100 mg/kg (es decir, 7,0 g); preferiblemente una dosis terapéuticamente eficaz es (para un mamífero de 70 kg) de desde aproximadamente 0,01 mg/kg (es decir, 0,7 mg) hasta aproximadamente 50 mg/kg (es decir, 3,5 g); más preferiblemente una dosis terapéuticamente eficaz es (para un mamífero de 70 kg) de desde aproximadamente 1 mg/kg (es decir, 70 mg) hasta aproximadamente 25 mg/kg (es decir, 1,75 g).

Las composiciones que comprenden los anticuerpos específicos de CD40 de la presente divulgación también pueden administrarse simultáneamente con, antes de, o tras la administración de uno o más de otros agentes terapéuticos. Tal terapia de combinación puede incluir administración de una formulación de dosificación farmacéutica individual que contiene un compuesto de la invención y uno o más agentes activos adicionales, así como la administración de composiciones que comprenden anticuerpos de la invención y cada agente activo en su propia formulación de dosificación farmacéutica separada. Por ejemplo, un anticuerpo tal como se describe en el presente documento y el otro agente activo pueden administrarse al paciente juntos en una composición de dosificación oral individual tal como un comprimido o cápsula, o administrarse cada agente en formulaciones de dosificación oral separadas. De manera similar, un anticuerpo tal como se describe en el presente documento y el otro agente activo pueden administrarse al paciente juntos en una composición de dosificación parenteral individual tal como en una disolución salina u otra disolución fisiológicamente aceptable, o administrarse cada agente en formulaciones de dosificación parenteral separadas. Cuando se usan formulaciones de dosificación separadas, las composiciones que comprenden anticuerpos y uno o más agentes activos adicionales pueden administrarse esencialmente al mismo tiempo, es decir, simultáneamente, o en tiempos escalonados por separado, es decir, secuencialmente y en cualquier orden; se entiende que la terapia de combinación incluye todos estos regímenes.

Por tanto, en determinadas realizaciones, también se contempla la administración de composiciones de anticuerpo anti-CD40 de esta divulgación en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos. Tales agentes terapéuticos pueden aceptarse en la técnica como tratamiento convencional para un estado patológico particular tal como se describe en el presente documento, tal como artritis reumatoide, inflamación o cáncer. Los agentes terapéuticos a modo de ejemplo contemplados incluyen citocinas, factores de crecimiento, esteroides, AINE, DMARD, antiinflamatorios, quimioterápicos, radioterápicos, u otros agentes activos y auxiliares.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD40 dados a conocer en el presente documento pueden administrarse junto con cualquier número de agentes quimioterápicos. Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™); sulfonatos de alquilo tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo alitretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosfaoramida y trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, authramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, calicheamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomycin, potfiomicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptoizocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-

metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamida glicósido; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK.RTM.; razoxana; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazonico; triaziquona; 2, 2', 2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhne-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilomitina (DMFO); derivados de ácido retinoico tales como Targretin™ (bexaroteno), Panretin™ (alitretinoína); ONTAK™ (denileukin difitox); esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables. También se incluyen en esta definición agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores tales como anti-estrógenos incluyendo por ejemplo tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles que inhiben aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (Fareston); y anti-andrógenos tales como flutamina, nilutamida, bicalutamida, leuprolído, y goserelina; y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.

Puede usarse una variedad de otros agentes terapéuticos junto con los anticuerpos anti-CD40 descritos en el presente documento. En una realización, el anticuerpo se administra con un agente antiinflamatorio. Los agentes antiinflamatorios o fármacos incluyen, pero no se limitan a, esteroides y glucocorticoides (incluyendo betametasona, budesonida, dexametasona, acetato de hidrocortisona, hidrocortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) incluyendo aspirina, ibuprofeno, naproxeno, metotrexato, sulfasalazina, leflunomida, medicaciones anti-TNF, ciclofosfamida y micofenolato.

Los AINE a modo de ejemplo se escogen del grupo que consiste en ibuprofeno, naproxeno, naproxeno sódico, inhibidores de la Cox-2 tales como VIOXX® (rofecoxib) y CELEBREX® (celecoxib), y sialilatos. Los analgésicos a modo de ejemplo se escogen del grupo que consiste en acetaminofeno, oxicodona, tramadol de clorhidrato de proporxifeno. Se escogen glucocorticoides a modo de ejemplo del grupo que consiste en cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona o prednisona. Los modificadores de la respuesta biológica a modo de ejemplo incluyen moléculas dirigidas contra marcadores de la superficie celular (por ejemplo, CD4, CD5, etc.), inhibidores de citocina, tales como los antagonistas de TNF (por ejemplo, etanorcept (ENBREL®), adalimumab (HUMIRA®) e infliximab (REMICADE®)), inhibidores de la quimiocina e inhibidores de molécula de adhesión. Los modificadores de la respuesta biológica incluyen anticuerpos monoclonales así como formas recombinantes de moléculas. Los DMARD a modo de ejemplo incluyen azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina, metotrexato, penicilamina, leflunomida, sulfasalazina, hidroxycloquina, oro (oral (auranofina) e intramuscular) y minociclina.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente documento se administran junto con una citocina. Por "citocina" tal como se usa en el presente documento se pretende un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúa en otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citocinas son linfocinas, monocinas y hormonas de polipéptido tradicionales. Se incluyen entre las citocinas hormonas de crecimiento tales como hormona del crecimiento humano, hormona del crecimiento humano de N-metionilo y hormona del crecimiento bovino; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas de glicoproteínas tales como hormona de estimulación folicular (FSH), hormona de estimulación tiroidea (TSH), y hormona leutinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia de inhibición mulleriana; péptido asociado con gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento vascular endotelial; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF-beta; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGF), tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento similar a la insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como macrófagos-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1 alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, un factor de necrosis tumoral tal como TNF-alfa o TNF-beta; y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y ligando kit (KL). Tal como se usa en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

Las composiciones que comprenden los anticuerpos específicos de CD40 descritos en el presente documento pueden administrarse a un individuo afectado por una enfermedad tal como se describe en el presente documento, incluyendo, pero sin limitarse a linfomas no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemias linfocíticas crónicas, leucemias

de tricoleucocitos, leucemias linfoblásticas agudas, mieloma múltiple, carcinomas del páncreas, colon, gástrico, intestino, próstata, vejiga, riñón, ovario, cuello uterino, mama, pulmón, nasofaringe, melanoma y leucemias y LNH resistentes a rituximab, enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias. Las enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero no se limitan a, artritis (incluyendo artritis reumatoide, artritis reactiva), lupus eritematoso sistémico (SLE), psoriasis y enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), encefalomiелitis, uveítis, miastenia grave, esclerosis múltiple, diabetes dependiente de insulina, enfermedad de Addison, celiaquía, síndrome de fatiga crónica, hepatitis autoinmunitaria, alopecia autoinmunitaria, espondilitis anquilosante, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, fibromialgia, pénfigo vulgar, síndrome de Sjogren, enfermedad de Kawasaki, hipertiroidismo/enfermedad de Graves, hipotiroidismo/enfermedad de Hashimoto, endometriosis, escleroderma, anemia perniciosa, síndrome de Goodpasture, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Wegener, glomerulonefritis, anemia aplásica (incluyendo pacientes con anemia aplásica con transfusión múltiple), hemoglobinuria paroxística nocturna, síndrome mielodisplásico, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica autoinmunitaria, síndrome de Evan, síndrome de inhibidor del factor VIII, vasculitis sistémica, dermatomiositis, polimiositis y fiebre reumática, síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (ALPS), penfigoide ampolloso autoinmunitario, enfermedad de Parkinson, sarcoidosis, vitiligo, cirrosis biliar primaria y miocarditis autoinmunitaria.

Las enfermedades inflamatorias incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Crohn, colitis, dermatitis, psoriasis, diverticulitis, hepatitis, síndrome de intestino irritable (IBS), lupus eritematoso, nefritis, enfermedad de Parkinson, colitis ulcerosa, esclerosis múltiple (EM), enfermedad de Alzheimer, artritis, artritis reumatoide, asma y diversas enfermedades cardiovasculares tales como aterosclerosis y vasculitis. En determinadas realizaciones, la enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, diabetes, gota, síndrome periódico asociado con criopirina y trastorno pulmonar obstructivo crónico. En este aspecto, una realización proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se describe en el presente documento para su uso en un método para tratar, reducir la gravedad de o prevenir la inflamación o una enfermedad inflamatoria administrando a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de composiciones dadas a conocer en el presente documento que comprenden anticuerpos anti-CD40.

Para el uso *in vivo* para el tratamiento de una enfermedad humana, los anticuerpos descritos en el presente documento se incorporan generalmente en una composición farmacéutica antes de la administración. Una composición farmacéutica comprende uno o más de los anticuerpos descritos en el presente documento en combinación con un portador o excipiente fisiológicamente aceptable tal como se describe en cualquier otra parte en el presente documento. Para preparar una composición farmacéutica, se mezcla una cantidad eficaz de uno o más de los compuestos con cualquier portador o excipiente farmacéutico conocido para los expertos en la técnica que es adecuado para el modo particular de administración. Un portador farmacéutico puede ser líquido, semisólido o sólido. Las disoluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica, subcutánea o tópica pueden incluir, por ejemplo, un diluyente estéril (tal como agua), disolución salina, aceite fijo, polietilenglicol, glicerina, propilenglicol u otro disolvente sintético; agentes antimicrobianos (tales como alcohol bencílico y metilparabenos); antioxidantes (tal como ácido ascórbico y bisulfito de sodio) y agentes quelantes (tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)); tampones (tal como acetatos, citratos y fosfatos). Si se administran por vía intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato (PBS), y disoluciones que contiene agentes espesantes y solubilizantes, tales como glucosa, polietilenglicol, polipropilenglicol y mezclas de los mismos.

Las composiciones que comprenden anticuerpos específicos de CD40 tal como se describe en el presente documento, pueden prepararse con portadores que protegen al anticuerpo contra la eliminación rápida del cuerpo, tales como formulaciones o recubrimientos de liberación prolongada. Tales portadores incluyen formulaciones de liberación controlada, tales como, pero no limitados a, implantes y sistemas de administración microencapsulados, y polímeros biocompatibles y biodegradables, tales como acetato de etileno-vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, PEG, poliortoésteres, ácido poliláctico y otros conocidos por los expertos en la técnica.

Se proporcionan en el presente documento composiciones que comprenden un anticuerpo anti-CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se describe en el presente documento para su uso en un método de tratamiento usando los anticuerpos que se unen a CD40. En una realización, un anticuerpo de la presente invención se administra a un paciente que tiene una enfermedad que implica expresión inapropiada de CD40, que se pretende en el contexto de la presente divulgación que incluya enfermedades y trastornos caracterizados por expresión o actividad de CD40 aberrante, debido por ejemplo, a alteraciones (por ejemplo, aumentos o disminuciones estadísticamente significativos) en la cantidad de una proteína presente, o la presencia de una proteína mutante, o ambas. Una abundancia en exceso puede deberse a cualquier causa, incluyendo pero sin limitarse a sobreexpresión al nivel molecular, aparición prolongada o acumulada en el sitio de acción, o actividad aumentada (por ejemplo, de manera estadísticamente significativa) de CD40 en relación con la que es normalmente detectable. Una abundancia en exceso de este tipo de CD40 puede medirse en relación con los acontecimientos de señalización expresión normal, aparición o actividad de CD40 normales, y dicha medición puede desempeñar un papel importante en el desarrollo y/o pruebas clínicas de los anticuerpos descritos en el presente documento.

Los presentes anticuerpos son útiles para el tratamiento de una variedad de cánceres. En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente documento ejercen actividad antitumoral activando

respuestas inmunitarias antitumorales. En determinadas realizaciones, los presentes anticuerpos son útiles para el tratamiento de una variedad de cánceres asociados con la expresión aberrante de CD40. En una realización de la invención se proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se describe en el presente documento para su uso en un método de tratamiento de un cáncer que incluye, pero no se limita a, linfomas no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemias linfocíticas crónicas, leucemias de tricoleucocitos, leucemias linfoblásticas agudas, mieloma múltiple, carcinomas del páncreas, colon, gástrico, intestino, próstata, vejiga, riñón, ovario, cuello uterino, mama, pulmón, nasofaringe, melanoma y leucemias y LNH resistentes a rituximab, administrando a un paciente con cáncer una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo específico de CD40 dado a conocer en el presente documento. Una cantidad que, tras la administración, inhibe, previene o retarda el avance y/o metástasis de un cáncer de manera estadísticamente significativa (es decir, en relación con un control apropiado tal como conocerán los expertos en la técnica) se considera eficaz.

Otra realización proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se describe en el presente documento para su uso en un método de prevención de metástasis de un cáncer que incluye, pero no se limita a, linfomas no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemias linfocíticas crónicas, leucemias de tricoleucocitos, leucemias linfoblásticas agudas, mieloma múltiple, carcinomas del páncreas, colon, gástrico, intestino, próstata, vejiga, riñón, ovario, cuello uterino, mama, pulmón, nasofaringe, melanoma y leucemias y LNH resistentes a rituximab, administrando a un paciente con cáncer una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo específico de CD40 dado a conocer en el presente documento (por ejemplo, una cantidad que, tras la administración, inhibe, previene o retarda metástasis de un cáncer de manera estadísticamente significativa, es decir, en relación con un control apropiado tal como conocerán los expertos en la técnica).

Otra realización proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se describe en el presente documento para su uso en un método de prevención de un cáncer que incluye, pero no se limita a, linfomas no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemias linfocíticas crónicas, leucemias de tricoleucocitos, leucemias linfoblásticas agudas, mieloma múltiple, carcinomas del páncreas, colon, gástrico, intestino, próstata, vejiga, riñón, ovario, cuello uterino, mama, pulmón, nasofaringe, melanoma y leucemias y LNH resistentes a rituximab, administrando a un paciente con cáncer una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo específico de CD40 dado a conocer en el presente documento.

Otra realización proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se describe en el presente documento para su uso en un método de tratamiento, mejora de los síntomas de, inhibición del avance de o prevención de linfomas no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemias linfocíticas crónicas, leucemias de tricoleucocitos, leucemias linfoblásticas agudas, mieloma múltiple, carcinomas del páncreas, colon, gástrico, intestino, próstata, vejiga, riñón, ovario, cuello uterino, mama, pulmón, nasofaringe, melanoma y leucemias y LNH resistentes a rituximab administrando a un paciente que padece una o más de estas enfermedades una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo específico de CD40 dado a conocer en el presente documento.

Otra realización proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se describe en el presente documento para su uso en un método de tratamiento, mejora de los síntomas de, inhibición del avance de o prevención de una enfermedad autoinmunitaria administrando a un paciente que padece una o más de estas enfermedades una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40 dado a conocer en el presente documento. En este aspecto, las enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero no se limitan a, artritis (incluyendo artritis reumatoide, artritis reactiva), lupus eritematoso sistémico (SLE), psoriasis y enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), encefalomiелitis, uveítis, miastenia grave, esclerosis múltiple, diabetes dependiente de insulina, enfermedad de Addison, celiaquía, síndrome de fatiga crónica, hepatitis autoinmunitaria, alopecia autoinmunitaria, espondilitis anquilosante, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, fibromialgia, pénfigo vulgar, síndrome de Sjogren, enfermedad de Kawasaki, hipertiroidismo/enfermedad de Graves, hipotiroidismo/enfermedad de Hashimoto, endometriosis, escleroderma, anemia perniciosa, síndrome de Goodpasture, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Wegener, glomerulonefritis, anemia aplásica (incluyendo pacientes con anemia aplásica con transfusión múltiple), hemoglobinuria paroxística nocturna, síndrome mielodisplásico, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica autoinmunitaria, síndrome de Evan, síndrome de inhibidor del factor VIII, vasculitis sistémica, dermatomiositis, polimiositis y fiebre reumática, síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (ALPS), penfigoide ampolloso autoinmunitario, enfermedad de Parkinson, sarcoidosis, vitíligo, cirrosis biliar primaria y miocarditis autoinmunitaria.

Otra realización proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se describe en el presente documento para su uso en un método de tratamiento, mejora de los síntomas de, inhibición del avance de o prevención de una enfermedad inflamatoria administrando a un paciente que padece una o más de estas enfermedades una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40 dado a conocer en el presente documento. Las enfermedades inflamatorias incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Crohn, colitis, dermatitis, psoriasis, diverticulitis, hepatitis, síndrome de intestino irritable (IBS), lupus eritematoso, nefritis, enfermedad de Parkinson, colitis ulcerosa, esclerosis múltiple (EM), enfermedad de Alzheimer, artritis, artritis reumatoide, asma, y diversas enfermedades cardiovasculares tales como aterosclerosis y vasculitis. En determinadas realizaciones, la enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en artritis

reumatoide, diabetes, gota, síndrome periódico asociado con criopirina y trastorno pulmonar obstructivo crónico.

En otra realización, se usan anticuerpos anti-CD40 de la presente invención para determinar la estructura de antígeno unido, por ejemplo, epítopos conformacionales, cuya estructura puede entonces usarse para desarrollar compuestos que tienen o que imitan esta estructura, por ejemplo, a través de método de modelado químico y SAR.

- 5 Otras diversas realizaciones de la presente invención se refieren, en parte, a aplicaciones de diagnóstico para detectar la presencia de células o tejidos que expresan CD40. Por tanto, la presente divulgación proporciona métodos de detectar CD40 en una muestra, tal como detección de células o tejidos que expresan CD40. Tales métodos pueden aplicarse en una variedad de formatos de detección conocidos, incluyendo, pero sin limitarse a inmunohistoquímica (IHC), inmunocitoquímica (ICC), hibridación *in situ* (ISH), hibridación de montaje completo *in situ* (WISH), hibridación de ADN fluorescente *in situ* (FISH), citometría de flujo, inmunoensayo de enzimas (EIA) e inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA).

- 15 ISH es un tipo de hibridación que usa una hebra de ADN o ARN complementaria marcada (es decir, agente de unión primario) para localizar una secuencia de ADN o ARN específica en una porción o sección de una célula o tejido (*in situ*), o si el tejido es lo suficientemente pequeño, todo el tejido (ISH de montaje completo). Un experto en la técnica apreciaría que esto es distinto de inmunohistoquímica, que localiza proteínas en secciones tisulares usando un anticuerpo como agente de unión primario. Puede usarse ISH de ADN en ADN genómico para determinar la estructura de cromosomas. Puede usarse ISH de ADN fluorescente (FISH), por ejemplo, en diagnóstico médico para evaluar la integridad cromosómica. Se usa ISH de ARN (histoquímica de hibridación) para medir y localizar ARNm y otros transcritos dentro de secciones tisulares o montajes completos.

- 20 En diversas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente documento se conjugan con un marcador detectable que puede detectarse directa o indirectamente. En este aspecto, un “conjugado” de anticuerpo se refiere a un anticuerpo anti-CD40 que se une de manera covalente a un marcador detectable. En la presente invención, sondas de ADN, sondas de ARN, anticuerpos monoclonales, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y derivados de anticuerpo de los mismos, tal como un anticuerpo de fragmento variable de cadenas sencillas o un anticuerpo marcado con epítopo, pueden unirse todos de manera covalente a un marcador detectable. En “detección directa”, sólo se usa un anticuerpo detectable, es decir, un anticuerpo detectable primario. Por tanto, detección directa significa que el anticuerpo que se conjuga con un marcador detectable puede detectarse, *per se*, sin la necesidad de adición de un segundo anticuerpo (anticuerpo secundario).

- 30 Un “marcador detectable” es una molécula o material que puede producir una señal detectable (tal como visual, electrónica u otra) que indica la presencia y/o concentración del marcador en una muestra. Cuando se conjuga con un anticuerpo, el marcador detectable puede usarse para localizar y/o cuantificar la diana a la que se dirige el anticuerpo específico. De ese modo, la presencia y/o concentración de la diana en una muestra puede detectarse detectando la señal producida mediante el marcador detectable. Un marcador detectable puede detectarse directa o indirectamente, y pueden usarse varios marcadores detectables diferentes conjugados con diferentes anticuerpos específicos en combinación para detectar una o más dianas.

- 35 Los ejemplos de marcadores detectables, que pueden detectarse directamente, incluyen colorantes fluorescentes y sustancias radiactivas y partículas de metal. En cambio, detección indirecta requiere la aplicación de uno o más anticuerpos adicionales, es decir, anticuerpos secundarios, tras la aplicación del anticuerpo primario. Por tanto, se realiza la detección mediante la detección de la unión del anticuerpo secundario o agente de unión al anticuerpo detectable primario. Los ejemplos de agentes de unión detectables primarios o anticuerpos que requieren adición de un agente o anticuerpo de unión secundario incluyen agentes de unión detectables enzimáticos y agentes de unión o anticuerpos detectables de haptenos.

- 45 En algunas realizaciones, el marcador detectable se conjuga con un polímero de ácido nucleico que comprende el primer agente de unión (por ejemplo, en un proceso ISH, WISH o FISH). En otras realizaciones, el marcador detectable se conjuga con un anticuerpo que comprende el primer agente de unión (por ejemplo, en un proceso IHC).

- 50 Los ejemplos de marcadores detectables que pueden conjugarse con los anticuerpos usados en los métodos de la presente divulgación incluyen marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos, radioisótopos, marcadores quimioluminiscentes, marcadores electroquimioluminiscentes, marcadores bioluminiscentes, polímeros, partículas de polímero, partículas de metal, haptenos y tintes.

- 55 Los ejemplos de marcadores fluorescentes incluyen 5-(y 6)-carboxifluoresceína, 5- o 6-carboxifluoresceína, ácido hexanoico de 6-(fluoresceína)-5-(y 6)-carboxamido, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, y colorantes tales como Cy2, Cy3, y Cy5, cumarina opcionalmente sustituida incluyendo AMCA, PerCP, ficobiliproteínas incluyendo R-ficoeritrina (RPE) y aloficoeritrina (APC), rojo Texas, rojo Princeton, proteína fluorescente verde (GFP) y análogos de los mismos, y conjugados de R-ficoeritrina o aloficoeritrina, marcadores fluorescentes inorgánicos tales como partículas basadas en material semiconductor como nanocristalitos de CdSe recubiertos.

Los ejemplos de marcadores de partículas de polímero incluyen micropartículas o partículas de látex de poliestireno,

PMMA o sílice, que pueden incrustarse con tintes fluorescentes, o micelas o cápsulas de polímero que contienen tintes, enzimas o sustratos.

Los ejemplos de marcadores de partículas de metal incluyen partículas de oro y partículas de oro recubiertas, que pueden convertirse por tinciones argénticas. Los ejemplos de haptenos incluyen DNP, isotiocianato de fluoresceína (FITC), biotina y digoxigenina. Los ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen peroxidasa del rábano (HRP), fosfatasa alcalina (ALP o AP), β -galactosidasa (GAL), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, β -N-acetilglucosaminidasa, β -glucuronidasa, invertasa, xantina oxidasa, luciferasa de luciérnaga y glucosa oxidasa (GO). Los ejemplos de sustratos comúnmente usados para peroxidasa del rábano incluyen 3,3'-diaminobencidina (DAB), diaminobencidina con potenciamiento con níquel, 3-amino-9-etilcarbazol (AEC), diclorhidrato de bencidina (BDHC), reactivo Hanks-Yates (HYR), azul de indofano (IB), tetrametilbencidina (TMB), 4-cloro-1-naftol (CN), α -naftol pironin (α -NP), o-dianisidina (OD), 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP), nitro azul de tetrazolio (NBT), cloruro de 2-(p-yodofenil)-3-p-nitrofenil-5-fenilo de tetrazolio (INT), azul tetranitro de tetrazolio (TNBT), 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-beta-D-galactósido/ferro-ferricianuro (BCIG/FF).

Los ejemplos de sustratos comúnmente usados para fosfatasa alcalina incluyen naftol-AS-B 1-fosfato/TR rojo rápido (NABP/FR), naftol-AS-MX-fosfato/TR rojo rápido (NAMP/FR), naftol-AS-B1-fosfato/-TR rojo rápido (NABP/FR), naftol-AS-MX-fosfato/TR rojo rápido (NAMP/FR), naftol-AS-B1-fosfato/nuevo fuschin (NABP/NF), fosfato de bromocloroindolilo/nitro azul de tetrazolio (BCIP/NBT), 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-d-galactopiranosido (BCIG).

Los ejemplos de marcadores luminiscentes incluyen luminol, isoluminol, ésteres de acridinio, 1,2-dioxetanos y piridopiridazinas. Los ejemplos de marcadores electroquimioluminiscentes incluyen derivados de rutenio. Los ejemplos de marcadores radiactivos incluyen isótopos radiactivos de yodo, cobalto, selenio, tritio, carbono, azufre y fósforo.

Los marcadores detectables pueden unirse a los anticuerpos descritos en el presente documento o a cualquier otra molécula que se une específicamente con un marcador biológico de interés, por ejemplo, un anticuerpo, una sonda de ácido nucleico o un polímero. Además, un experto habitual en la técnica apreciaría que también pueden conjugarse marcadores detectables con agentes de unión o anticuerpos segundo, y/o tercero, y/o cuarto, y/o quinto, etc. Además, el experto en la técnica apreciaría que cada agente de unión o anticuerpo adicional usado para caracterizar un marcador biológico de interés puede servir como etapa de amplificación de señales. El marcador biológico puede detectarse visualmente usando, por ejemplo, microscopía óptica, microscopía fluorescente, microscopía electrónica donde la sustancia detectable es, por ejemplo, un tinte, una partícula de oro coloidal, un reactivo luminiscente. También pueden detectarse sustancias visualmente unidas a un marcador biológico usando un espectrofotómetro. Cuando la sustancia detectable es un isótopo radiactivo, la detección puede ser visualmente mediante autorradiografía, o no visualmente usando un contador de centelleo. Véase, por ejemplo, Larsson, 1988, *Immunocytochemistry: Theory and Practice*, (CRC Press, Boca Raton, Fla.); *Methods in Molecular Biology*, vol. 80 1998, John D. Pound (ed.) (Humana Press, Totowa, N.J.).

La divulgación proporciona además kits para detectar CD40 o células o tejidos que expresan CD40 en una muestra, en donde los kits contienen al menos un anticuerpo, polipéptido, polinucleótido, vector o célula huésped tal como se describe en el presente documento. En determinadas realizaciones, un kit puede comprender tampones, enzimas, marcadores, sustratos, perlas u otras superficies a las que se unen los anticuerpos de la invención, y similares, e instrucciones para su uso.

Ejemplos

Ejemplo 1

Producción y humanización de anticuerpos anti-CD40

Se inmunizaron cuatro conejos blancos de Nueva Zelanda con Fc-hCD40 de conejo recombinante. Se escogió el conejo con los mayores títulos séricos de unión específica a CD40 humano para fusión celular. Se identificó un total de 172 hibridomas como agentes de unión positivos para Fc-hCD40 soluble, de los cuales se encontró que 44 clones eran agentes de unión positivos para CD40 de superficie celular. Después del ensayo de agrupamiento de epítopos, se seleccionaron 24 hibridomas representativos para expresión recombinante y caracterización adicional. Se llevó a cabo cribado funcional secundario tal como se describe adicionalmente a continuación e incluyó: 1) inducción de maduración de CD tal como se mide mediante regulación por incremento de CD80, CD83, CD86 (actividad agonista); 2) inducción de inhibición de crecimiento tumoral directa (actividad agonista); y 3) función efectora de anticuerpo CCDA. Se seleccionaron candidatos basándose en exámenes funcionales duales que incluyeron dos grupos: 1) afinidad de unión, internalización de anticuerpos, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), y fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP); y 2) función de activación/maduración de CD agonista, interacción receptor-ligando, reacción de linfocitos mixta (MLR), proliferación y apoptosis celular.

Cribado de anticuerpos agonistas por medio de maduración de células dendríticas

Para aclarar adicionalmente el efecto agonista o antagonista del panel inicial de anticuerpos anti-CD40, se usó un

ensayo de maduración CD como indicador para cribar anticuerpos funcionales. Se añadieron anticuerpos anti-CD40 o de control a disolución en cultivo de CD derivadas de monocitos humanos durante 2 días. Se midió la regulación por incremento de CD83, uno de los marcadores de maduración mejor conocidos para células dendríticas humanas, para cribar anticuerpos agonistas. Se usó 5C11, un anticuerpo monoclonal de ratón que induce maduración de células dendríticas como control positivo. Los anticuerpos R-3, R-6, R-8, R-9, R-16, R-18, R-24, R-33, R-36, 19-21, 19-45 y 19-59 aumentaron más del 50% de la expresión de CD83 en comparación con control de Ig (figura 1A). Se determinó además la maduración de CD midiendo la regulación por incremento inducida por anticuerpos de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 para los anticuerpos seleccionados. Tal como se muestra en la figura 1B y la figura 1C, los anticuerpos R-3, R-8, R-9, R-33 y 19-21 regularon por incremento tanto CD80 como CD86, mientras que los otros anticuerpos sólo tuvieron efectos modestos. Estos resultados son coherentes con los efectos de modulación de CD83 por estos anticuerpos. De manera interesante, entre los anticuerpos que pueden inducir maduración de CD, sólo el clon 19-21 mostró fuerte actividad para potenciar la proliferación de células T en una reacción de linfocitos mixta (figura 1D).

Cribado para inhibición directa de crecimiento tumoral

Se evaluó adicionalmente el panel de anticuerpos anti-CD40 agonistas para determinar la capacidad de inducir la inhibición de crecimiento tumoral de células tumorales que expresan CD40. Todos los anticuerpos anti-CD40 sometidos a prueba inhibieron la proliferación de células tumorales. El anticuerpo 19-21 demostró la potencia más alta. (Figura 2).

Cribado para actividad de CCDA

Además de inducción de la activación de APC y la inhibición del crecimiento tumoral, se usó la función efectora de anticuerpo, CCDA, como criterio importante para cribar y clasificar los candidatos a anticuerpo. Con el fin de realizar el ensayo de CCDA usando PBMC humanas, todos los anticuerpos seleccionados se convirtieron de Acm de conejo a Acm quimérico con Fab de conejo e IgG1 humana. Tal como se muestra en la figura 3, todos los candidatos seleccionados mostraron actividad de CCDA significativa en comparación con control de IgG1. Basándose en la actividad de CCDA máxima, los Acm líderes pueden clasificarse cR-8 > cR-3 > cR-33 > c19-21 > cR-9 > c19-59.

Se seleccionaron cuatro candidatos (c19-21, cR-8, cR-3, cR-33) basándose en cribado funcional *in vitro*. Sus caracterizaciones *in vitro* se resumen en la tabla 1. El anticuerpo c19-21 potencia fuertemente la activación de CD y la inhibición del crecimiento tumoral, mientras que los anticuerpos cR-8 y cR-3 mostraron una actividad de CCDA más potente.

Tabla 1. Características de 4 anticuerpos anti-CD40 candidatos:

Anticuerpo	c19-21	cR-8	cR3	cR33
Bloquea la unión a CD40L	Sí	Sí	Sí	Sí
Potencia la maduración de CD	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte
Actividad pro-apoptosis (CI50)	0,02 µg/ml	0,45 µg/ml	0,57 µg/ml	0,90 µg/ml
CCDA (% de citotoxicidad de célula Ramos a 1 µg/ml)	26%	33%	30%	29%

Cribado de actividad antitumoral in vivo

Como los 4 candidatos superiores mostraron diferentes potencias en diferentes ensayos *in vitro*, se realizaron estudios *in vivo* para evaluar y comparar su actividad antitumoral para selección líder. Se usó el modelo de xenoinjerto tumoral de Ramos. Se trataron ratones que tenían tumores i.p. con 5mg/kg de anticuerpos quiméricos cR-3, cR-8, cR-33 o c19-21 3 veces a la semana durante un total de 9 dosis (ocho animales por grupo). Se usó la actividad antitumoral de rituximab con el mismo régimen como referencia. Tal como se muestra en la figura 4A, cR-8 y cR-3 mostraron el efecto antitumoral más fuerte. En cambio, 19-21 presentó menor actividad antitumoral con rebote tumoral más rápido tras terminación de la dosificación. El efecto antitumoral de cR-33 estuvo entre medias, pero aún presentó mejor eficacia *in vivo* que rituximab. La potencia *in vivo* de anticuerpos cR-3 y cR-8 se evaluó adicionalmente en un estudio de respuesta a la dosis. Tal como se muestra en la figura 4B, cR-8 mostró una eficacia antitumoral más potente que cR-3, y por tanto se identificó como el anticuerpo anti-CD40 líder.

Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera del clon R-8 se exponen en SEQ ID NO: 1 y 2. Las secuencias de aminoácidos de las CDR de la VH y VL se exponen en SEQ ID

NO: 3-5 y 6-8, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de las secuencias de cadena pesada y cadena ligera de varios de los otros candidatos a anticuerpo que mostraron actividad funcional se exponen en SEQ ID NO: 11-56. Se proporcionan secuencias de aminoácidos de VHCDR y VLCDR para estos anticuerpos en SEQ ID NO: 57-194. La figura 16 muestra una alineación de estas secuencias, incluyendo el clon R-8, con CDR subrayadas.

- 5 Se humanizó R-8 usando una tecnología de humanización guiada por linaje mutacional (MLG) propia (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 7.462.697). La región de marco de cadena ligera y pesada del R-8 humanizado (APX005) es el 95% idéntica a las secuencias de línea germinal humanas. La secuencia de aminoácidos de las regiones VH y VL humanizadas se exponen en SEQ ID NO: 9 y 10, respectivamente. Se encontró que la unión de APX005 a CD40 era similar a su clon R-8 parental.

10 Ejemplo 2

Caracterización *in vitro* del anticuerpo anti-CD40 humanizado APX005

Se realizaron numerosos experimentos *in vitro* para caracterizar adicionalmente el anticuerpo humanizado APX005.

APX005 se une selectivamente a CD40

- 15 Se evaluó la selectividad de unión de APX005 mediante ELISA directo a un panel de proteínas de la familia TNFR. Se recubrió un total de 1 µg/ml de proteína de fusión de Fc de conejo y CD40, RANK, TweakR, OX40, DR5 y 4-1BB sobre placas de ELISA. Se detectó APX005 unido usando IgG conjugada anti-HRP humano de cabra. Tal como se muestra en la figura 5, APX005 se une selectivamente a CD40 humano pero no a otras proteínas de la familia TNFR sometidas a prueba.

APX005 bloquea la unión de CD40L a CD40

- 20 Se realizó un ELISA para evaluar el efecto de APX005 sobre la unión de CD40L a CD40. En particular, se usó CD40L (concentración final 4 µg/ml) para unir el CD40 humano inmovilizado sobre una placa de ELISA, y se midieron cambios en la cantidad de unión de CD40L a CD40 tras preincubar CD40 inmovilizado con APX005. Se detectó unión de CD40L a CD40 inmovilizado mediante un anticuerpo monoclonal anti-CD40L de ratón. Tal como se muestra en la figura 6, APX005 bloquea la unión de CD40L a CD40. En cambio, SGN-40 aumenta la unión.

25 *El complejo APX005/CD40 no está internalizado*

- Con el fin de valorar la internalización mediada por diana de APX005 para evaluar su impacto sobre la actividad de CCDA, se incubaron células Ramos con APX005 durante 4 h a 37°C, una temperatura que permite la internalización, o a 4°C durante 30 minutos, una temperatura a la que se minimiza la internalización. Se lavaron las células con tampón de tinción, seguido por incubación con anti-IgG humana de cabra marcada con Alexa 488 durante unos 30 minutos adicionales a 4°C. Se realizó análisis de FACS para examinar el nivel de APX005 sobre la superficie celular. Tal como se muestra en la figura 7, no hubo reducción (ligero aumento) del nivel de APX005 sobre la superficie celular tras incubación a 37°C. Los datos sugieren que tras la unión a CD40, el complejo APX005/CD40 no se internalizó por células tumorales proporcionando, por tanto, proporcionando condiciones óptimas para reclutar las células efectoras para CCDA.

35 *APX005 media CCDA*

- Con el fin de valorar la actividad de CCDA de APX005 en células tumorales que expresan CD40, se usaron Ramos y Daudi que expresaban CD40 como células diana y se usaron células mononucleares de sangre periférica humana nuevas (PBMC) como células efectoras. Se midió la CCDA mediante un ensayo de liberación de calceína-AM. Se marcaron células diana con calceína-AM (15 µM/10⁶ células), se lavaron y se sembraron en placa por triplicado a 5 x 10³ por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Se preincubaron concentraciones crecientes (0,0001-10 µg/ml) de o bien anticuerpos APX005 o bien de control a 4°C durante 30 minutos, tras lo cual se añadieron células efectoras PBMC de donantes humanos sanos con una razón célula efectora:diana final de 40:1 en un volumen final de 200 µl por pocillo. Se realizaron experimentos usando PBMC de al menos tres donantes diferentes. Tras una incubación de 4 horas, se transfirieron 100 µl de sobrenadantes de cultivo a una placa de 96 placas Black View y se leyeron unidades fluorescentes arbitrarias (UFA) en un lector de placas Victor II (485 nm de excitación/535 nm de emisión). Porcentaje de lisis específica = (liberación experimental media de UFA - liberación espontánea media de UFA)/(liberación máxima media de UFA - liberación espontánea media de UFA). Tal como se muestra en la figura 8, APX005 indujo CCDA de manera dependiente de la dosis. Se observó un efecto similar para SGN-40. La diferente sensibilidad de células Ramos y Daudi a la CCDA puede deberse a diferente nivel de expresión de CD40 (Cancer Res 2005; 65: 8331-8338).

APX005 inhibe la proliferación de células tumorales

Para valorar la capacidad de APX005 de inhibir la proliferación de células tumorales, se sembraron células Ramos en placas de fondo plano de 96 pocillos a 50.000 células/pocillo en 200 µl de RPMI 1640 complementado con FBS al 10% que contiene concentraciones variables de APX005, SGN-40 o una IgG humana de control. Para reticular, se

preincubaron APX005, SGN-40 o IgG de control con fragmentos F(ab')₂ de un anticuerpo específico del fragmento Fc anti-IgG humana de cabra en el medio durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de añadirse a las células. Se trataron las células durante un total de 72 horas. Entonces se añadió AlamarBlue® al 10% (Serotec, Oxford, R.U.) a cada pocillo y se incubó durante unas 24 horas adicionales. Se midió la viabilidad celular mediante un lector de fluorescencia CytoFluor con una longitud de onda de excitación de 530 nm y longitud de onda de emisión de 590 nm. Todos los estudios se realizaron dos veces y por triplicado para cada concentración de muestra. Tal como se muestra en la figura 9, el monómero APX005 inhibió la proliferación de células Ramos (figura 9A). Cuando se reticuló APX005 mediante un anticuerpo secundario, suministró un efecto inhibitor de la proliferación dependiente de la dosis y aumentado (figura 9B). La reticulación de APX005 puede lograrse *in vivo* mediante células que expresan el receptor Fc.

APX005 induce activación de CD

Con el fin de valorar la capacidad de APX005 de estimular la maduración de células CD, se prepararon PBMC mediante centrifugación de densidad en gradiente usando disolución de aislamiento de linfocitos. Se recogieron monocitos adherentes tras incubar durante 2 horas a 37°C. Se cultivaron monocitos aislados con 100 ng/ml de GM-CSF humano recombinante y 100 ng/ml de IL-4 humana recombinante en medios RPMI1640 complementados con FCS al 10% en una placa de 24 pocillos. Se cambió la mitad del medio tras 3 días. El día 5 de cultivo, se añadieron 1,3 nM de anticuerpos anti-CD40, CD40L o el anticuerpo de control a las células CD, y se cultivaron adicionalmente durante 48 h en una placa de 24 pocillos. Para tinción de marcador para activación de CD, se usaron anticuerpo anti-CD83, anticuerpo anti-CD86 y anticuerpo anti-CD80 conjugados con PE. Se realizó análisis usando FACS. Los datos son de un estudio representativo. Tal como se muestra en la figura 10, APX005 indujo maduración de CD marcada y su efecto parece más potente que SGN-40 y CD40L. Una activación aumentada de CD puede conducir a respuestas de células T antitumorales más potentes.

APX005 tiene reactividad cruzada con CD40 de mono pero no CD40 de ratón

Se evaluó la reactividad cruzada mediante ELISA directo. Se recubrió un total de 1 µg/ml de CD40 humano, CD40 de mono o CD40 de ratón sobre placas de ELISA seguido por incubación con 1 µg/ml de APX005 o IgG1 de control. Se detectaron anticuerpos unidos a CD40 usando anti-IgG humana de cabra conjugado con HRP. APX005 reacciona de manera cruzada claramente con CD40 de mono pero no CD40 de ratón. (Figura 11A)

Se determinó adicionalmente la reactividad cruzada de APX005 con CD40 de ratón mediante unión de FACS a una línea celular de ratón A20 que expresa CD40 de ratón. Se añadió una alícuota de $0,5 \times 10^6$ células A20 a placas de 96 pocillos y se incubó con 100 µl de anticuerpo anti-CD40 de ratón diluido de rata conjugado con anticuerpos de control PE, APX005 o IgG1. Tras lavar, se añadieron 100 µl de anti-IgG de cabra (H+L) conjugado con R-PE (Southern Biotech, n.º de CAT 2040-09) a dilución 1:200 en PBS a la muestra y se incubaron para la detección de APX005 e IgG1 de control humana. Se usó un anticuerpo anti-CD40 de ratón de rata conjugado con PE como control positivo. Se resuspendieron muestras con 0,5 ml de PBS y se analizaron mediante FACS. Los datos de FACS mostraron que APX005 no reacciona de manera cruzada con CD40 de ratón (figura 11B).

En resumen, los experimentos en este ejemplo mostraron que APX005 es un anticuerpo IgG1 humanizado que se une a CD40. APX005 se une específicamente a CD40 con una K_d de $9,6 \times 10^{-10}$ M y bloquea la unión de CD40L a CD40. Esto contrasta con el anticuerpo anti-CD40 SGN40 que potencia la interacción CD40-CD40L. Esto sugiere que estos dos anticuerpos se unen a distintos epítomos. *In vitro*, APX005 mostró una actividad potente de CCDA frente a células de linfoma positivas CD40 (Ramos y Daudi) así como la capacidad de inhibir directamente la proliferación de células tumorales (Ramos) tras reticulación. APX005 también estimuló la maduración de células dendríticas para potenciar la respuesta inmunitaria celular. Además, se demostró que APX005 reaccionaba de manera cruzada con CD40 de mono.

Ejemplo 3

Caracterización *in vivo* del anticuerpo anti-CD40 humanizado APX005

Se realizaron numerosos experimentos *in vivo* para caracterizar adicionalmente el anticuerpo humanizado APX005.

Inhibición de APX005 del crecimiento tumoral en el modelo Ramos

Con el fin de evaluar el efecto de APX005 en el modelo de xenoinjerto de linfoma de células B humanas, se usaron ratones BALB/c nu/nu hembra de 6-8 semanas de edad para inoculación de células tumorales. Se establecieron xenoinjertos mediante inoculación subcutánea de 1×10^7 células tumorales/ratón en los flancos dorsales. Cuando los tumores alcanzaron un volumen promedio de aproximadamente 100 mm³ (50-200 mm³), se aleatorizaron los animales en grupos. Se administraron anticuerpos por vía intraperitoneal a 3 mg/kg empezando el día 13 (véase la figura 12). Se administró la dosificación 3 veces a la semana durante un total de 9 dosis (ocho animales por grupo). Se midieron dimensiones perpendiculares del tumor usando un compás de escala Vernier. Se calcularon los volúmenes tumorales usando la fórmula: Volumen = (longitud x ancho²)/2. Tal como se muestra en la figura 12A, APX005 demostró una actividad antitumoral potente y de larga duración. Se tomó suero el día 34, dos días después de la última dosificación, para determinar niveles de fármaco *in vivo* midiendo concentraciones de IgG humana

(véase la figura 12B). La eficacia antitumoral mediada por APX005 fue mayor que la de SGN-40 y persistió mucho después del último periodo de dosificación. El análisis de PK de único punto mostró que la actividad antitumoral superior de APX005 no se debía a la diferencia de PK.

Inhibición de APX005 de tumores pretratados con y resistentes a rituximab

- 5 El fin de este experimento era evaluar el efecto de APX005 sobre linfoma de células B pretratado con y resistente a rituximab. En primer lugar se trataron ratones desnudos que portaban tumores Ramos establecidos con rituximab a 3 mg/kg para 5 dosis. Se inhibió parcialmente el crecimiento mediante rituximab (figura 13A). Cuando estos tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 700 mm³, se aleatorizaron en 4 grupos (7 animales por grupo) y volvieron a tratarse i.p. con APX005, rituximab, análogo de SGN40 3 mg/kg o control salino durante 3 semanas (figura 13B). Tal como se muestra en la figura 13, los tumores pretratados con rituximab no respondieron al nuevo tratamiento con rituximab, lo que sugiere que estos tumores son resistentes a rituximab (figura 13B). APX005 presentó la capacidad de inhibir el crecimiento de tumores resistentes a rituximab.

Inhibición de APX005 de crecimiento tumoral en el modelo Raji

- 15 El fin de este experimento era determinar la relación de dosis y eficacia de APX005 *in vivo*. Se trataron ratones desnudos que portaban tumores Raji positivos para CD40 establecidos con APX005 empezando el día 15. Se administraron i.p. dosis de APX005 que oscilaban entre 0,1 mg/kg - 10 mg/kg 3 veces/semana durante 2 semanas (ocho animales por grupo) (véase la figura 14). Se usó solución salina como tratamiento de control. Se midieron volúmenes tumorales en cada día de dosificación. También se midieron los niveles séricos de APX005 en cada grupo 3 días después de la última dosificación para determinar la correlación de la eficacia *in vivo* con los niveles de APX005 en la circulación. Se observó una actividad antitumoral dependiente de la dosis evidente (véase la figura 14). La diferencias en volúmenes tumorales fueron significativas ($P \leq 0,05$) entre el grupo de control y los grupos de tratamiento con anticuerpo con niveles de dosis ≥ 1 mg/kg los días 29 a 33. Se determinó la dosis eficaz mínima como 1 mg/kg, que se corresponde con una concentración sérica mediana de 0,49 µg/ml el día 36. Las diferencias en volúmenes tumorales entre los grupos de dosis de 3, 5 y 10 mg/kg no fueron estadísticamente significativas. Por tanto, se logró la actividad antitumoral máxima a dosis ≥ 3 mg/kg con una concentración sérica mediana $\geq 1,6$ µg/ml.

Inhibición de crecimiento tumoral en modelo MM IM-9 humano mediante APX005

- Con el fin de evaluar la actividad antitumoral de APX005 en modelo de mieloma múltiple humano, se trataron i.p. ratones desnudos que portaban tumores IM-9 de mieloma múltiple positivos para CD40 establecidos con APX005 o SGN40 empezando el día 15. APX005 se proporcionó a 3 mg/kg, 3 veces/semana durante 3 semanas (5 animales por grupo). Se midieron los volúmenes tumorales en cada día de dosificación.

APX005 demostró una potente actividad antitumoral contra mieloma múltiple humano en el modelo de xenoinjerto IM-9 (véase la figura 15). La eficacia antitumoral mediada por APX005 fue significativamente mayor que la de SGN-40 ($P < 0,05$).

Inhibición de crecimiento tumoral en el modelo Ramos mediante APX005 en comparación con SGN-40 y rituximab

- 35 El fin de este experimento era comparar la actividad antitumoral de APX005, rituximab y SGN-40 en un modelo de xenoinjerto Ramos de linfoma de células B humano. Se establecieron xenoinjertos mediante inoculación subcutánea de células Ramos en los flancos dorsales de ratones SCID C.B-17 hembra. Cuando los tumores alcanzaron un volumen promedio de aproximadamente 200-300 mm³, se aleatorizaron los animales en 6 grupos. Se administraron anticuerpos por vía intraperitoneal en dosis tal como se indicó en la figura 17. Se administró la dosificación 3 veces a la semana durante un total de 9 dosis (10 animales por grupo). Se midieron dimensiones perpendiculares del tumor usando un compás de escala Vernier. Se calcularon los volúmenes tumorales usando la fórmula: Volumen = (longitud x ancho²)/2. También se determinó y se registró la supervivencia de los ratones.

- APX005 demostró actividad antitumoral dependiente de la dosis. El tratamiento con la dosis alta de APX005 (10 mg/kg) dio como resultado remisión tumoral completa, mientras que rituximab a la misma dosis (10 mg/kg) sólo retrasó el crecimiento tumoral, lo que sugiere que APX005 es más eficaz que rituximab en este modelo. APX005 también es más potente que SGN-40 (figura 17A). APX005 no sólo inhibió el crecimiento tumoral sino que también mejoró la supervivencia de los animales que portan tumores (figura 17B).

Inhibición de crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de linfoma Namalwa humano resistente a rituximab

- 50 El fin de este experimento era comparar la actividad antitumoral de APX005, rituximab y SGN-40 en el modelo de linfoma Namalwa humano resistente a rituximab. Se establecieron xenoinjertos mediante inoculación subcutánea de células Namalwa en los flancos dorsales de ratones SCID C.B -17 hembra. Cuando los tumores alcanzaron un volumen promedio de aproximadamente 200-300 mm³, se aleatorizaron los animales en 6 grupos. Se administraron anticuerpos i.p. a las dosis indicadas en la figura 18. Se administró la dosificación 3 veces a la semana durante un total de 9 dosis (10 animales por grupo). Se midieron dimensiones perpendiculares del tumor usando un compás de escala Vernier. Se calcularon volúmenes tumorales usando la fórmula: Volumen = (longitud x ancho²)/2. También se determinó y se registró la supervivencia de los ratones.

APX005 demostró una potente actividad antitumoral en modelo de linfoma Namalwa resistente a rituximab (figura 18A). APX005 también mejoró la supervivencia de ratones que portan tumores resistentes a rituximab (figura 18B).

En resumen, los experimentos en este ejemplo mostraron que la eficacia de APX005 se examinó en múltiples modelos tumorales de xenoinjerto. APX005 inhibió notablemente el crecimiento tumoral en el modelo Ramos. De manera interesante, el efecto terapéutico persistió más allá del periodo de dosificación. El tratamiento con APX005 dio como resultado inhibición de tumores pretratados con y resistentes a rituximab. Se realizó un estudio de hallazgo del intervalo de dosis en el modelo Raji y se encontró que se determinó la dosis eficaz mínima como 1 mg/kg, y se observó la actividad antitumoral máxima a dosis ≥ 3 mg/kg. Además del linfoma de células B, APX005 también presentó una potente actividad antitumoral significativa en el modelo IM-9 de mieloma múltiple humano.

Por tanto, los ejemplos anteriores demuestran que APX005 puede usarse para mejorar el tratamiento de pacientes con LNH, CLL, mieloma múltiple y determinados tumores sólidos que expresan la diana CD40. Tras la unión a CD40, APX005 recluta células citotóxicas para destruir células tumorales por medio de CCDA. APX005 también puede inhibir directamente la proliferación de células tumorales y activar APC por medio de su actividad agonista. *In vivo*, APX005 inhibió marcadamente el crecimiento de múltiples xenoinjertos de tumor humano que expresan CD40 y mostraron efectos antitumorales de larga duración. APX005 también puede inhibir mieloma múltiple humano y tumores pretratados con y resistentes a rituximab.

Lista de secuencias

<110> Zhang, Yongke Yu,

Guo-Liang

Zhu, Weimin

<120> ANTICUERPOS ANTI-CD40 Y MÉTODOS DE USO

<130> APEX-013/02WO 315697-2028

<160> 194

<170> PetentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 137

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 1

ES 2 709 654 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Gly Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Thr Tyr Val Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

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

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Pro Ser Ser Thr Thr Val
85 90 95

Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
100 105 110

Cys Ala Arg Pro Asp Ile Thr Tyr Gly Phe Ala Ile Asn Phe Trp Gly
115 120 125

Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 2

<211> 131

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 2

ES 2 709 654 T3

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

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

Ser Ala Ser Glu Pro Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala
35 40 45

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

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

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

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

Cys Thr Gly Tyr Gly Ile Ser Trp Pro Ile Gly Gly Gly Thr Glu Val
115 120 125

Val Val Lys
130

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 3

Gly Phe Ser Phe Ser Ser Thr Tyr Val Cys
1 5 10

<210> 4

<211> 17

10 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 4

Cys Ile Tyr Thr Gly Asp Gly Thr Asn Tyr Ser Ala Ser Trp Ala Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 5

<211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 5
 Pro Asp Ile Thr Tyr Gly Phe Ala Ile Asn Phe
 1 5 10
 <210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 10 <400> 6
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Arg Leu Ala
 1 5 10
 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 15 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 7
 Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 8
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 8
 Gln Cys Thr Gly Tyr Gly Ile Ser Trp Pro
 1 5 10
 <210> 9
 25 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Región VH de APX005, la versión humanizada del anticuerpo anti-CD40 de conejo R-8
 30 <400> 9
 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 Ser Phe Ser Ser Thr
 20 25 30

ES 2 709 654 T3

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

Ala Cys Ile Tyr Thr Gly Asp Gly Thr Asn Tyr Ser Ala Ser Trp Ala
50 55 60

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

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

Ala Arg Pro Asp Ile Thr Tyr Gly Phe Ala Ile Asn Phe Trp Gly Pro
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10

<211> 130

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región VL de APX005, la versión humanizada del anticuerpo anti-CD40 de conejo R-8

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 709 654 T3

Thr Gly Tyr Gly Ile Ser Trp Pro Ile Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
115 120 125

Ile Lys
130

<210> 11

<211> 144

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 11

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

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

Asp Ser Phe Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Cys Ile His Ala Leu Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

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

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

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Tyr Ala Gly Tyr Ala Asp Tyr Asn Val Ala
115 120 125

Thr Gly Leu Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 12

<211> 143

10 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 12

ES 2 709 654 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

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

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

Leu Glu Trp Ile Gly Cys Ile Asp Thr Gly Arg Gly Tyr Thr Tyr His
65 70 75 80

Ala Ser Gly Ala Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Lys Thr Ser Ser Thr
85 90 95

Thr Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Ser Tyr Val Arg Tyr Asp Asn Arg Asn Tyr
115 120 125

Gly Phe Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 13

<211> 138

5 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 13

ES 2 709 654 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

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

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

Trp Ile Ala Cys Thr Tyr Thr Gly Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Thr Ser Ser Thr Thr
85 90 95

Val Thr Leu Gln Leu Thr Gly Leu Thr Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr
100 105 110

Phe Cys Ala Arg Pro Asp Val Gly Phe Asp Phe Ala Ile Asn Phe Trp
115 120 125

Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 14

<211> 137

5 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 14

ES 2 709 654 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

Gly Gly Thr Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asn
35 40 45

Tyr Tyr Trp Pro Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

Trp Val Ala Cys Leu Asn Gly Gly Asp Ser Asp Thr Thr Val Tyr Ala
65 70 75 80

Arg Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Ser Thr Thr
85 90 95

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

Phe Cys Ala Arg Tyr Ile Ile Pro Gly Tyr His Phe Asn Leu Trp Gly
115 120 125

Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 15

<211> 138

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 15

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

ES 2 709 654 T3

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

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

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

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

Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr
85 90 95

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

Phe Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Asn Asp Gly Ser Tyr Tyr Asn Leu Trp
115 120 125

Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 16

<211> 141

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 16

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

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

Arg Gly Tyr Tyr Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

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

Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Thr Ser Ser Thr Thr
85 90 95

ES 2 709 654 T3

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

Phe Cys Ala Arg Glu Asp Ala Gly Asn Asp Asp Tyr Gly Tyr Ala Arg
115 120 125

Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 17

<211> 138

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 17

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Ala Arg Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Ser Thr
85 90 95

Thr Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Ile Ile Pro Gly Tyr Asn Phe Asn Leu Trp
115 120 125

Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 18

<211> 139

10 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 18

ES 2 709 654 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Ser Thr Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
50 55 60

Leu Glu Trp Ile Gly Cys Ile Asn Ser Asp Asp Ser Gly Thr Asn Val
65 70 75 80

Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Ser
85 90 95

Thr Thr Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala
100 105 110

Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Pro Ile Pro Gly Tyr His Phe Asn Leu
115 120 125

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 19

<211> 131

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 19

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro
20 25 30

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asp Leu Ser
35 40 45

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

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

ES 2 709 654 T3

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

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

Arg Gly Tyr Asn Thr Met Ala Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr
115 120 125

Val Ser Ser
130

<210> 20

<211> 136

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 20

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro
20 25 30

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Asn Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
35 40 45

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

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

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

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

Gly Asp Ala Asp Gly Gly Val Val Ser Tyr Phe His Val Trp Gly Pro
115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 21

<211> 136

10 <212> PRT

ES 2 709 654 T3

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 21

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro
20 25 30

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

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

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

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

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

Arg Ile Trp Arg Pro Asp Asp Pro Thr Asn Ser Asp Ile Trp Gly Pro
115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 22

5 <211> 130

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 22

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

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

Ala Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Thr Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45

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

ES 2 709 654 T3

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

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

Ile Ser Gly Val Gln Arg Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly
100 105 110

Ser Phe Thr Gly Ser Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu
115 120 125

Ile Leu
130

<210> 23

<211> 134

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 23

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

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

Ser Val Glu Ala Ala Val Gly Gly Thr Ile Thr Ile Asn Cys Gln Ala
35 40 45

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

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

Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu
85 90 95

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

Ser Asn Tyr Gly Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Gly Phe Gly Gly Gly
115 120 125

Thr Glu Val Val Val Lys
130

<210> 24

<211> 131

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

5 <400> 24

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

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

Ser Ala Ser Glu Pro Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala
35 40 45

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

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

Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu
85 90 95

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

Cys Thr Gly Tyr Thr Ile Ser Trp Pro Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val
115 120 125

Val Val Lys
130

<210> 25

<211> 132

<212> PRT

10 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 25

ES 2 709 654 T3

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

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

Gly Tyr Ser His Ile Asn Val Asp Asn Ile Phe Gly Gly Gly Phe Gln
115 120 125

Val Val Val Lys
130

<210> 26

<211> 133

5 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 26

ES 2 709 654 T3

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

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

Ser Val Glu Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala
35 40 45

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

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

Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu
85 90 95

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

Arg Tyr Ser Trp Asn Gly Ser Tyr Gly Val Ser Phe Gly Gly Gly Thr
115 120 125

Glu Val Val Val Arg

130

<210> 27

<211> 135

5 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 27

ES 2 709 654 T3

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

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

Ser Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala
35 40 45

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

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

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

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

Ser His Tyr Phe Gly Ser Ser Ser Gly Tyr Ala Asn Thr Phe Gly Gly
115 120 125

Gly Thr Glu Val Val Val Lys
130 135

<210> 28

<211> 132

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 28

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

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
20 25 30

Val Glu Val Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser
35 40 45

ES 2 709 654 T3

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

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

Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Thr Gly Val Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

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

Val Val Val Lys
130

<210> 29

<211> 132

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 29

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

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
20 25 30

Val Glu Val Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45

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

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

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

Ile Ser Gly Val Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

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

Val Val Val Lys
130

<210> 30

<211> 133

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 30

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

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro
20 25 30

Val Ser Ala Pro Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser
35 40 45

Gln Asn Val Leu Ile Asn Asn Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

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

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Ala Gly Tyr Ser Ser Gly Asp Gly Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr
115 120 125

Glu Val Val Val Lys
130

<210> 31

<211> 132

10 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 31

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

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
20 25 30

ES 2 709 654 T3

Val Glu Val Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45

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

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

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

Ile Ser Gly Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Gly Tyr Asn Ser Arg His Val Asp Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu
115 120 125

Val Val Val Lys
130

<210> 32

<211> 132

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 32

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

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

Thr Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45

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

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

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

Ile Ser Gly Val Gln Arg Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly
100 105 110

ES 2 709 654 T3

Gly Tyr Ala Thr Ala Ala Tyr Arg Thr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu
115 120 125

Leu Glu Ile Leu
130

<210> 33

<211> 138

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 33

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

Pro Glu Gly Ser Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Asn Gly Phe Ser Phe
35 40 45

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

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

Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ser Thr Ser Leu
85 90 95

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

Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Gly Gly Tyr Ala Ala Tyr Asp Leu Trp
115 120 125

Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 34

<211> 139

10 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 34

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

ES 2 709 654 T3

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

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

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

Leu Glu Trp Ile Gly Cys Ile Tyr Ala Thr Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Pro Thr Thr
85 90 95

Val Thr Leu Gln Met Pro Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr
100 105 110

Phe Cys Ala Arg Asp Ile Val Gly Asp Asn Ile Tyr Tyr Phe Asn Phe
115 120 125

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 35

<211> 139

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 35

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

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

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

Leu Glu Trp Ile Gly Cys Ile Tyr Val Gly His Asp Ser Leu Tyr Tyr
65 70 75 80

Ala Gly Trp Ala Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr
85 90 95

ES 2 709 654 T3

Thr Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ala Ser Ile Thr Asn Ser Tyr Phe Ser Leu
115 120 125

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 36

<211> 142

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 36

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

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

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

Leu Glu Trp Ile Ala Cys Ile Gly Ala Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

Ala Thr Trp Thr Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Lys Thr Ser Trp Thr
85 90 95

Thr Val Ser Leu Glu Met Thr Ser Leu Thr Gly Ala Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Asp Pro Gly Asn Asp Asp Tyr Gly Tyr Ala
115 120 125

Asp Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 37

<211> 144

10 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 37

ES 2 709 654 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

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

Asp Ser Phe Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Cys Ile His Ala Leu Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

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

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

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Tyr Ala Gly Tyr Ala Asp Tyr Asn Val Ala
115 120 125

Thr Gly Leu Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 38

<211> 139

5 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 38

ES 2 709 654 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

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

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

Leu Glu Trp Ile Gly Cys Ile Tyr Val Gly His Asp Ser Leu Tyr Tyr
65 70 75 80

Ala Gly Trp Ala Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr
85 90 95

Thr Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ala Ser Ile Thr Asn Ser Tyr Phe Ser Leu
115 120 125

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 39

<211> 139

5 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 39

ES 2 709 654 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

Pro Glu Gly Ser Leu Thr Leu Thr Ser Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45

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

Leu Glu Trp Ile Ala Cys Ile Ser Ala Gly Ser Ser Gly His Thr Tyr
65 70 75 80

Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Lys Thr Ser Ser
85 90 95

Thr Thr Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala
100 105 110

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

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 40

<211> 144

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 40

ES 2 709 654 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

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

Asp Ser Phe Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Cys Ile His Ala Leu Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

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

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

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Tyr Ala Gly Tyr Ala Asp Tyr Asn Val Ala
115 120 125

Thr Gly Leu Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 41

<211> 144

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 41

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

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

Gly Thr Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Ala Cys Ile Tyr Ala Gly Ala Ser Gly Asn Ser Tyr Tyr
65 70 75 80

ES 2 709 654 T3

Ala Asn Trp Ala Gln Gly Arg Phe Ile Ile Ser Lys Arg Ser Ser Thr
85 90 95

Ala Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr
100 105 110

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

Thr Gly Leu Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 42

<211> 134

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 42

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

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

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

Tyr Ile Gly Leu Ile Ala Thr Gly Gly Gly Thr Phe Tyr Thr Asn Trp
65 70 75 80

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

Lys Met Pro Ser Pro Gln Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Val
100 105 110

Arg Gly Tyr Pro Gly Ser Ser Asp Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser
130

<210> 43

<211> 135

10 <212> PRT

ES 2 709 654 T3

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 43

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro
20 25 30

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

Thr Tyr Asp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

Trp Leu Gly Leu Ile Asn Thr Ile Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp
65 70 75 80

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

Lys Met Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Val
100 105 110

Arg Gly Val Pro Gly Tyr Ser Ser Ser Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly
115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 44

5 <211> 134

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 44

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ile Ser Gly Phe Ser Leu Ser
35 40 45

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

ES 2 709 654 T3

Tyr Ile Gly Ile Ile Ala Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asn Trp
65 70 75 80

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

Lys Met Thr Ser Pro Gln Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Val
100 105 110

Arg Gly Tyr Pro Gly Ser Ser Asp Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser
130

<210> 45

<211> 134

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 45

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

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro
20 25 30

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

Lys Ser Val Tyr Asn Asn Asn Trp Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

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

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

Leu Thr Ile Ser Asp Val Val Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Ala Gly Tyr Glu Ser Val Asn Thr Asp Gly His Ala Phe Gly Gly Gly
115 120 125

Thr Glu Val Val Val Lys
130

<210> 46

<211> 132

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

5 <400> 46

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

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

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser
35 40 45

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

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

Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr
85 90 95

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

Gly Tyr Thr Tyr Ser Ser Val Asp Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu
115 120 125

Val Val Val Lys
130

<210> 47

<211> 131

<212> PRT

10 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 47

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

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

Val Ser Glu Pro Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45

ES 2 709 654 T3

Glu Asp Ile Phe Ser Asn Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
50 55 60

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

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

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

Ala Tyr Tyr Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val
115 120 125

Val Val Lys
130

<210> 48

<211> 135

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 48

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

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

Ser Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala
35 40 45

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

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

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

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

Ser His Tyr Phe Asp Ser Ser Ser Gly Tyr Gly Asn Thr Phe Gly Gly
115 120 125

Gly Thr Glu Val Val Val Lys
130 135

<210> 49

<211> 130

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 49

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

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

Ala Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45

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

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

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

Ile Ser Gly Val Gln Arg Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly
100 105 110

Ser Phe Thr Gly Ser Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu
115 120 125

Ile Leu
130

<210> 50

<211> 131

10 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 50

15

ES 2 709 654 T3

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

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

5 Val Ser Glu Pro Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser

35 40 45

Glu Asp Ile Phe Ser Asn Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
50 55 60

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

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

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

Ala Tyr Tyr Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val
115 120 125

Val Val Lys
130

<210> 51

<211> 130

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 51

ES 2 709 654 T3

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

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

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

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

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

Ser Ser Arg Phe Glu Gly Ser Arg Ser Val Thr Glu Tyr Thr Leu Thr
85 90 95

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

Thr Tyr Tyr Gly Asn Gly His Pro Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val
115 120 125

Val Lys
130

<210> 52

<211> 130

5 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 52

ES 2 709 654 T3

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

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

Ala Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45

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

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

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

Ile Ser Gly Val Gln Arg Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly
100 105 110

Ser Phe Thr Gly Ser Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu
115 120 125

Ile Leu
130

<210> 53

<211> 130

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 53

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

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

ES 2 709 654 T3

Thr Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45

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

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

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

Ile Ser Gly Val Gln Arg Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly
100 105 110

Ser Phe Thr Gly Ser Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu
115 120 125

Ile Leu
130

<210> 54

<211> 119

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 54

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

Ala Ser Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Ser Ile Ser Cys Gln
20 25 30

Ser Ser Lys Ser Val Tyr Asn Lys His His Leu Ala Trp Leu Gln Gln
35 40 45

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

Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln
65 70 75 80

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Pro Ser Asp Ser Asp Asn Thr Phe Gly Gly
100 105 110

Gly Thr Glu Val Val Val Glu
115

<210> 55

<211> 134

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 55

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

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser
20 25 30

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

Glu Ser Val Asp Ser Asn Lys Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

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

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Asp Val Val Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Ala Gly Tyr Lys Ala Thr Thr Thr Asp Ala Ser Ala Phe Gly Gly Gly
115 120 125

Thr Glu Val Val Val Lys
130

<210> 56

<211> 133

10 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 56

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

15

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

ES 2 709 654 T3

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

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

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Thr Pro Ala Ser
5 65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Leu Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
10 100 105 110

Ala Gly Gly Tyr Asn Ser Asp Ser Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr
115 120 125

Glu Val Val Val Glu
130

15

<210> 57
<211> 11
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

20

<400> 57

Gly Phe Ser Phe Ser Ala Asn Tyr Tyr Met Cys
1 5 10

<210> 58
<211> 11
<212> PRT

25

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 58

Gly Phe Ser Phe Ser Asp Ser Phe Trp Ile Ala
1 5 10

<210> 59
<211> 11

30

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 59

Gly Phe Asp Leu Ser Ser Thr Tyr Tyr Met Cys
1 5 10

<210> 60

35

<211> 11

```

<212> PRT
<213> Oryctolagus cuniculus
<400> 60
  Gly Phe Ser Phe Ser Ser Ser Tyr Ser Met Cys
  1             5             10
5  <210> 61
    <211> 11
    <212> PRT
    <213> Oryctolagus cuniculus
    <400> 61
      Gly Phe Ser Phe Gly Ser Gly Tyr Tyr Met Cys
      1             5             10
10 <210> 62
     <211> 10
     <212> PRT
     <213> Oryctolagus cuniculus
15 <400> 62
     Arg Phe Ser Phe Ser Ser Thr Tyr Met Cys
     1             5             10
     <210> 63
     <211> 11
     <212> PRT
20 <213> Oryctolagus cuniculus
    <400> 63
      Gly Phe Ser Phe Ser Arg Gly Tyr Tyr Met Cys
      1             5             10
      <210> 64
      <211> 11
25 <212> PRT
    <213> Oryctolagus cuniculus
    <400> 64
      Gly Phe Ser Phe Ser Asp Ser Phe Trp Ile Ala
      1             5             10
      <210> 65
30 <211> 10
    <212> PRT
    <213> Oryctolagus cuniculus
    <400> 65

```

Gly Phe Ser Leu Asn Tyr Tyr Trp Pro Cys
 1 5 10
 <210> 66
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 66
 Gly Ile Asp Phe Ser Ser Tyr Tyr Tyr Met Cys
 1 5 10
 <210> 67
 <211> 11
 10 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 67
 Gly Phe Ser Phe Gly Ser Gly Tyr Tyr Met Cys
 1 5 10
 <210> 68
 15 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 68
 Gly Phe Ser Phe Ser Arg Gly Tyr Tyr Ile Cys
 1 5 10
 20 <210> 69
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 69
 Gly Phe Ser Leu Ser Ser Ser Tyr Phe Met Cys
 25 1 5 10
 <210> 70
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 30 <400> 70
 Gly Phe Ser Phe Ser Asp Ser Phe Trp Ile Ala
 1 5 10
 <210> 71
 <211> 11

<212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 71
 Gly Phe Ser Phe Ser Ser Ser Tyr Trp Ile Cys
 1 5 10
 5 <210> 72
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 72
 Gly Phe Ser Phe Ser Gly Thr Tyr Trp Ile Cys
 10 1 5 10
 <210> 73
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 15 <400> 73
 Gly Phe Ser Phe Ser Ser Thr Tyr Trp Ile Cys
 1 5 10
 <210> 74
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 74
 Gly Phe Asp Leu Ser Ser Asn Ala Met Asn
 1 5 10
 <210> 75
 <211> 10
 25 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 75
 Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala Val Asn
 1 5 10
 <210> 76
 30 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 76

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Asp Met Thr
 1 5 10
 <210> 77
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 77
 Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Asn
 1 5 10
 <210> 78
 <211> 10
 10 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 78
 Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala Val Asp
 1 5 10
 <210> 79
 15 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 79
 Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr Val Met Arg
 1 5 10
 20 <210> 80
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 80
 Cys Ile Tyr Ala Ser Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 1 5 10 15
 25 Gly
 <210> 81
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 30 <400> 81

Cys Ile His Ala Leu Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala
1 5 10 15

Arg Gly

<210> 82

<211> 16

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 82

Cys Ile Tyr Ala Thr Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 83

<211> 17

10 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 83

Cys Ile Asp Thr Gly Arg Gly Tyr Thr Tyr His Ala Ser Gly Ala Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 84

15 <211> 17

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 84

Cys Ile Tyr Val Gly His Asp Ser Leu Tyr Tyr Ala Gly Trp Ala Arg
1 5 10 15

Gly

20 <210> 85

<211> 18

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 85

Cys Thr Tyr Thr Gly Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
1 5 10 15

25 Lys Gly

<210> 86

<211> 17

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 86

Cys Ile Gly Ala Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Thr Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 87

<211> 18

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 87

Cys Ile His Ala Leu Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala
1 5 10 15

Arg Gly

<210> 88

<211> 18

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 88

Cys Leu Asn Gly Gly Asp Ser Asp Thr Thr Val Tyr Ala Arg Trp Ala
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 89

<211> 17

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 89

Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 90

<211> 17

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 90

Cys Ile Tyr Val Gly His Asp Ser Leu Tyr Tyr Ala Gly Trp Ala Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 91

<211> 17

5 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 91

Cys Ile Gly Ala Gly Ser Gly Gly Thr Tyr Phe Ala Ser Trp Ala Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 92

10 <211> 18

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 92

Cys Ile Ser Ala Gly Ser Ser Gly His Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
1 5 10 15

Lys Gly

15 <210> 93

<211> 18

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 93

Cys Ile His Ala Leu Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala
1 5 10 15

20 Arg Gly

<210> 94

<211> 18

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

25 <400> 94

Cys Ile Asn Thr Gly Ser Ser Val Thr Thr Val Tyr Ala Arg Trp Ala
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 95

<211> 18

<212> PRT

5 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 95

Cys Ile Tyr Ala Gly Ala Ser Gly Asn Ser Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala
1 5 10 15

Gln Gly

<210> 96

<211> 18

10 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 96

Cys Ile Asn Ser Asp Asp Ser Gly Thr Asn Val Tyr Ala Asn Trp Ala
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 97

15 <211> 16

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 97

Tyr Ile Thr Ile Ser Gly Ser Ala Gly Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

20 <210> 98

<211> 16

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 98

25 Leu Ile Ala Thr Gly Gly Gly Thr Phe Tyr Thr Asn Trp Ala Arg Gly
1 5 10 15

<210> 99

<211> 16

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 99
 Leu Ile Asn Thr Ile Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Ser Gly
 1 5 10 15
 <210> 100
 5 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 100
 Val Ile Trp Asn Asn Gly Glu Ile Phe Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 10 <210> 101
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 101
 Ile Ile Ala Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asn Trp Ala Lys Gly
 15 1 5 10 15
 <210> 102
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 20 <400> 102
 Val Ile Ser Ser Ala Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Asp
 1 5 10 15
 <210> 103
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 103
 Ser Gly Gly Tyr Ala Ala Tyr Asp Leu
 1 5
 <210> 104
 <211> 16
 30 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 104
 Ser Tyr Ala Gly Tyr Ala Asp Tyr Asn Val Ala Thr Gly Leu Asn Leu
 1 5 10 15

<210> 105
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

5 <400> 105
 Asp Ile Val Gly Asp Asn Ile Tyr Tyr Phe Asn Phe
 1 5 10
 <210> 106
 <211> 15
 <212> PRT

10 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 106
 Ser Ser Tyr Val Arg Tyr Asp Asn Arg Asn Tyr Gly Phe Asn Leu
 1 5 10 15
 <210> 107
 <211> 11
 <212> PRT

15 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 107
 Gly Ala Ser Ile Thr Asn Ser Tyr Phe Ser Leu
 1 5 10
 <210> 108

20 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 108
 Pro Asp Val Gly Phe Asp Phe Ala Ile Asn Phe
 1 5 10

25 <210> 109
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 109
 Glu Asp Pro Gly Asn Asp Asp Tyr Gly Tyr Ala Asp Asn Leu
 30 1 5 10
 <210> 110
 <211> 16
 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 110

Ser Tyr Ala Gly Tyr Ala Asp Tyr Asn Val Ala Thr Gly Leu Asn Leu
1 5 10 15

<210> 111

5 <211> 10

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 111

Tyr Ile Ile Pro Gly Tyr His Phe Asn Leu
1 5 10

10 <210> 112

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 112

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

<210> 113

<211> 11

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 113

Gly Ala Ser Ile Thr Asn Ser Tyr Phe Ser Leu
1 5 10

<210> 114

<211> 14

<212> PRT

25 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 114

Glu Asp Ala Gly Asn Asp Asp Tyr Gly Tyr Ala Arg Asn Leu
1 5 10

<210> 115

<211> 10

30 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 115

Ala Ser Ala Asp Val Gly Asp Tyr Ser Leu
1 5 10

<210> 116
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

5 <400> 116
 Ser Tyr Ala Gly Tyr Ala Asp Tyr Asn Val Ala Thr Gly Leu Asn Leu
 1 5 10 15
 <210> 117
 <211> 10
 <212> PRT

10 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 117
 Tyr Ile Ile Pro Gly Tyr Asn Phe Asn Leu
 1 5 10
 <210> 118
 <211> 16
 <212> PRT

15 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 118
 Ser Tyr Thr Gly Tyr Ala Asp Tyr Asn Val Ala Thr Gly Leu Asn Leu
 1 5 10 15
 <210> 119
 <211> 10
 <212> PRT

20 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 119
 Tyr Pro Ile Pro Gly Tyr His Phe Asn Leu
 1 5 10
 <210> 120
 <211> 7
 <212> PRT

25 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 120
 Gly Tyr Asn Thr Met Ala Ile
 1 5
 <210> 121
 <211> 10
 <212> PRT

30

<213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 121
 Gly Tyr Pro Gly Ser Ser Asp Phe Asn Ile
 1 5 10
 <210> 122
 5 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 122
 Gly Val Pro Gly Tyr Ser Ser Ser Phe Asn Ile
 1 5 10
 10 <210> 123
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 123
 Asp Ala Asp Gly Gly Val Val Ser Tyr Phe His Val
 15 1 5 10
 <210> 124
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 20 <400> 124
 Gly Tyr Pro Gly Ser Ser Asp Phe Asn Ile
 1 5 10
 <210> 125
 <211> 12
 <212> PRT
 25 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 125
 Ile Trp Arg Pro Asp Asp Pro Thr Asn Ser Asp Ile
 1 5 10
 <210> 126
 <211> 13
 30 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 126

Gln Ser Ser Lys Ser Val Tyr Asn Asn Asn Trp Leu Ser
1 5 10
<210> 127
<211> 11
<212> PRT
5 <213> *Oryctolagus cuniculus*
<400> 127
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Tyr Leu Ala
1 5 10
<210> 128
<211> 11
10 <212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*
<400> 128
Gln Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asn Glu Leu Ser
1 5 10
15 <210> 129
<211> 11
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*
<400> 129
Gln Ala Ser Glu Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ser
20 1 5 10
<210> 130
<211> 11
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*
25 <400> 130
Gln Ala Ser Glu Asp Ile Phe Ser Asn Leu Gly
1 5 10
<210> 131
<211> 11
<212> PRT
30 <213> *Oryctolagus cuniculus*
<400> 131
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Arg Leu Ala
1 5 10
<210> 132

<211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 132
 Gln Ala Ser Glu Thr Ile Tyr Thr Leu Leu Ala
 5 1 5 10
 <210> 133
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 10 <400> 133
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 <210> 134
 <211> 11
 <212> PRT
 15 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 134
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Tyr
 1 5 10
 <210> 135
 <211> 11
 20 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 135
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Thr Trp Leu Ala
 1 5 10
 <210> 136
 25 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 136
 Gln Ala Ser Glu Asp Ile Phe Ser Asn Leu Gly
 1 5 10
 30 <210> 137
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 137
 Gln Ala Ser Glu Ser Ala Tyr Thr Leu Leu Ala
 1 5 10
 <210> 138
 <211> 11
 5 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 138
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Tyr Leu Ala
 1 5 10
 <210> 139
 10 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 139
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 15 <210> 140
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 140
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Tyr
 20 1 5 10
 <210> 141
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25 <400> 141
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 <210> 142
 <211> 11
 <212> PRT
 30 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 142
 Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Gly Tyr Leu Phe
 1 5 10
 <210> 143

<211> 13
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 143
 Gln Ser Ser Gln Asn Val Leu Ile Asn Asn Arg Leu Ala
 5 1 5 10
 <210> 144
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 10 <400> 144
 Gln Ser Ser Lys Ser Val Tyr Asn Lys His His Leu Ala
 1 5 10
 <210> 145
 <211> 13
 <212> PRT
 15 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 145
 Gln Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Asn Lys Arg Leu Ala
 1 5 10
 <210> 146
 <211> 11
 20 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 146
 Gln Ala Ser Gln Thr Ile Tyr Thr Tyr Leu Ala
 1 5 10
 <210> 147
 25 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 147
 Gln Ser Ser Lys Ser Val Tyr Asn Lys Asn His Leu Ala
 1 5 10
 30 <210> 148
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 148
 Gln Ala Ser Glu Ser Ile Ser Ser Ser Leu Ala
 1 5 10
 <210> 149
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 149
 Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 150
 10 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 150
 Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5
 15 <210> 151
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 151
 Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 20 1 5
 <210> 152
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25 <400> 152
 Tyr Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 153
 <211> 7
 <212> PRT
 30 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 153
 Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5
 <210> 154

<211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 154
 Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 5 1 5
 <210> 155
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 10 <400> 155
 Arg Ala Ser Thr Leu Glu Ser
 1 5
 <210> 156
 <211> 7
 <212> PRT
 15 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 156
 Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 157
 <211> 7
 20 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 157
 Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 158
 25 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 158
 Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5
 30 <210> 159
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 159
Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5
 <210> 160
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 160
Gly Ala Ser Ile Leu Glu Ser
 1 5
 <210> 161
 10 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 161
Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5
 15 <210> 162
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 162
Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser
 20 1 5
 <210> 163
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25 <400> 163
Asp Ala Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 164
 <211> 7
 <212> PRT
 30 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 164
Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 165

<211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 165
 Glu Ala Ser Lys Leu Pro Ser
 5 1 5
 <210> 166
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 10 <400> 166
 Asp Ala Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 167
 <211> 7
 <212> PRT
 15 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 167
 Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 168
 <211> 7
 20 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 168
 Thr Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 169
 25 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 169
 Glu Ala Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5
 30 <210> 170
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 170
Tyr Thr Ser Thr Pro Ala Ser
1 5
<210> 171
<211> 7
5 <212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*
<400> 171
Tyr Ala Ser Asp Leu Ala Ser
1 5
<210> 172
10 <211> 12
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*
<400> 172
Ala Gly Tyr Glu Ser Val Asn Thr Asp Gly His Ala
1 5 10
15 <210> 173
<211> 10
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*
<400> 173
Leu Gly Ser Phe Thr Gly Ser Asp Thr Thr
20 1 5 10
<210> 174
<211> 12
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*
25 <400> 174
Gln Gln Gly Tyr Thr Tyr Ser Ser Val Asp Asn Val
1 5 10
<210> 175
<211> 13
<212> PRT
30 <213> *Oryctolagus cuniculus*
<400> 175
Gln Ser Asn Tyr Gly Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Gly
1 5 10
<210> 176

<211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 176
 5 Gln Ser Ala Tyr Tyr Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 <210> 177
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 10 <400> 177
 Gln Cys Thr Gly Tyr Thr Ile Ser Trp Pro
 1 5 10
 <210> 178
 <211> 14
 <212> PRT
 15 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 178
 Gln Ser His Tyr Phe Asp Ser Ser Ser Gly Tyr Gly Asn Thr
 1 5 10
 <210> 179
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 179
 Leu Gly Ser Phe Thr Gly Ser Asp Thr Thr
 1 5 10
 <210> 180
 25 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 180
 Gln Gln Gly Tyr Ser His Ile Asn Val Asp Asn Ile
 1 5 10
 30 <210> 181
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 181
 Gln Arg Tyr Ser Trp Asn Gly Ser Tyr Gly Val Ser
 1 5 10
 <210> 182
 <211> 11
 5 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 182
 Gln Ser Ala Tyr Tyr Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 <210> 183
 10 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 183
 Gln Ser His Tyr Phe Gly Ser Ser Ser Gly Tyr Ala Asn Thr
 1 5 10
 15 <210> 184
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 184
 Gln Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Gly His Pro
 20 1 5 10
 <210> 185
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25 <400> 185
 Leu Gly Ser Phe Thr Gly Ser Asp Thr Thr
 1 5 10
 <210> 186
 <211> 12
 <212> PRT
 30 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 186
 Gln Gln Gly Tyr Ser His Ile Asn Val Asp Asn Ile
 1 5 10
 <210> 187

<211> 10
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 187
 Leu Gly Ser Phe Thr Gly Ser Asp Thr Thr
 5 1 5 10
 <210> 188
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 10 <400> 188
 Gln Gln Ser Tyr Ser His Ile Asn Val Asp Asn Ile
 1 5 10
 <210> 189
 <211> 11
 <212> PRT
 15 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 189
 Gln Ala Gly Tyr Ser Ser Gly Asp Gly Asn Ala
 1 5 10
 <210> 190
 <211> 11
 20 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 190
 Ala Gly Gly Tyr Pro Ser Asp Ser Asp Asn Thr
 1 5 10
 <210> 191
 25 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 191
 Ala Gly Tyr Lys Ala Thr Thr Thr Asp Ala Ser Ala
 30 1 5 10
 <210> 192
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 192

Gln Gln Gly Tyr Asn Ser Arg His Val Asp Asn Val
1 5 10

<210> 193

<211> 11

5 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 193

Ala Gly Gly Tyr Asn Ser Asp Ser Asp Asn Thr
1 5 10

<210> 194

10 <211> 12

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 194

Leu Gly Gly Tyr Ala Thr Ala Ala Tyr Arg Thr Ala
1 5 10

15

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a CD40 y es un agonista de CD40, que comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende la región VHCDR1 expuesta en SEQ ID NO:3, la región VHCDR2 expuesta en SEQ ID NO:4 y la región VHCDR3 expuesta en SEQ ID NO:5; (ii) una región variable de cadena ligera que comprende la región VLCDR1 expuesta en SEQ ID NO:6, la región VLCDR2 expuesta en SEQ ID NO:7 y la región VLCDR3 expuesta en SEQ ID NO: 8.
2. Anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1, en el que
 - (a) la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:1; o
 - (b) la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:2.
3. Anticuerpo aislado según la reivindicación 1, en el que
 - (a) el anticuerpo está humanizado;
 - (b) el anticuerpo está humanizado, en el que la región VH comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:9 y la región VL comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:10;
 - (c) el anticuerpo es un anticuerpo completo; o
 - (d) el anticuerpo aislado comprende un dominio constante de IgG humana, en el que opcionalmente el dominio constante de IgG comprende un dominio CH1 de IgG1 o una región Fc de IgG1.
4. Anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que el anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo:
 - a. activa células presentadoras de antígeno;
 - b. estimula la liberación de citocinas a partir de células presentadoras de antígeno;
 - c. induce la apoptosis de células tumorales;
 - d. inhibe la proliferación de células tumorales;
 - e. destruye células tumorales a través de la inducción de funciones efectoras seleccionadas del grupo que consiste en citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, citotoxicidad dependiente de complemento y fagocitosis celular dependiente de anticuerpos;
 - f. estimula respuestas de células T antitumorales;
 - g. reduce tumores establecidos;
 - h. inhibe tumores resistentes a rituximab; o
 - i. una combinación de una cualquiera o más de a. - h.
5. Polinucleótido aislado que codifica para el anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3b y 4.
6. Vector de expresión que comprende el polinucleótido aislado según la reivindicación 5.
7. Célula huésped aislada que comprende el vector según la reivindicación 6.
8. Composición que comprende un portador fisiológicamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3b y 4.
9. Composición según la reivindicación 8 para su uso en
 - (a) un método para tratar o mejorar los síntomas en un paciente que tiene un cáncer, que comprende administrar al paciente la composición según la reivindicación 8, tratando o mejorando de ese modo los síntomas en el paciente que tiene el cáncer, en el que opcionalmente el cáncer se selecciona del grupo que consiste en linfomas no de Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemias linfocíticas crónicas, tricoleucemias, leucemias linfoblásticas agudas, mieloma múltiple, carcinomas de vejiga, riñón, ovario, cuello uterino, mama, pulmón, nasofaringe, melanoma maligno y leucemias y LNH resistentes a rituximab;

(b) un método para mejorar síntomas en un paciente que tiene una enfermedad autoinmunitaria que comprende administrar al paciente la composición según la reivindicación 8, mejorando de ese modo los síntomas en el paciente que tiene la enfermedad autoinmunitaria; o

5 (c) un método para mejorar síntomas en un paciente que tiene una enfermedad inflamatoria que comprende administrar al paciente la composición según la reivindicación 8, mejorando de ese modo los síntomas en el paciente que tiene la enfermedad inflamatoria.

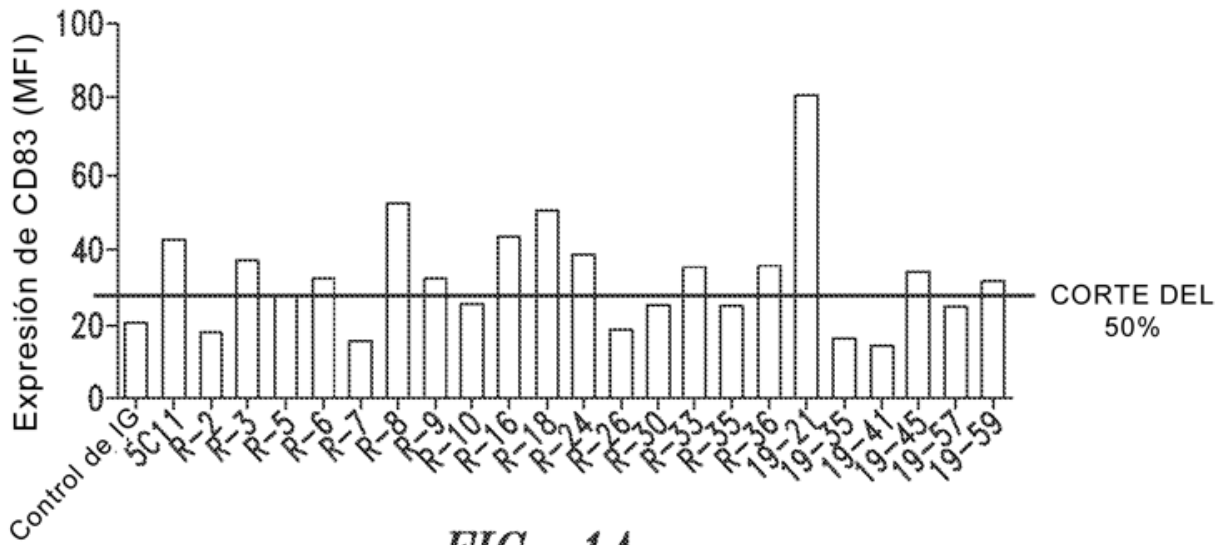


FIG. 1A

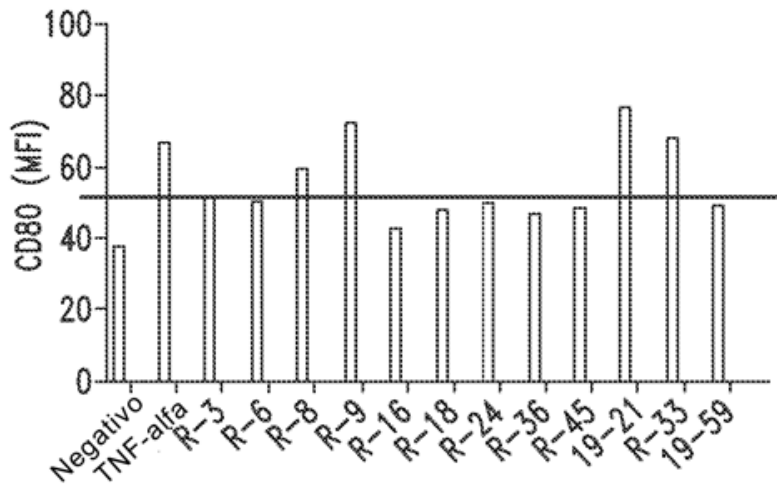


FIG. 1B

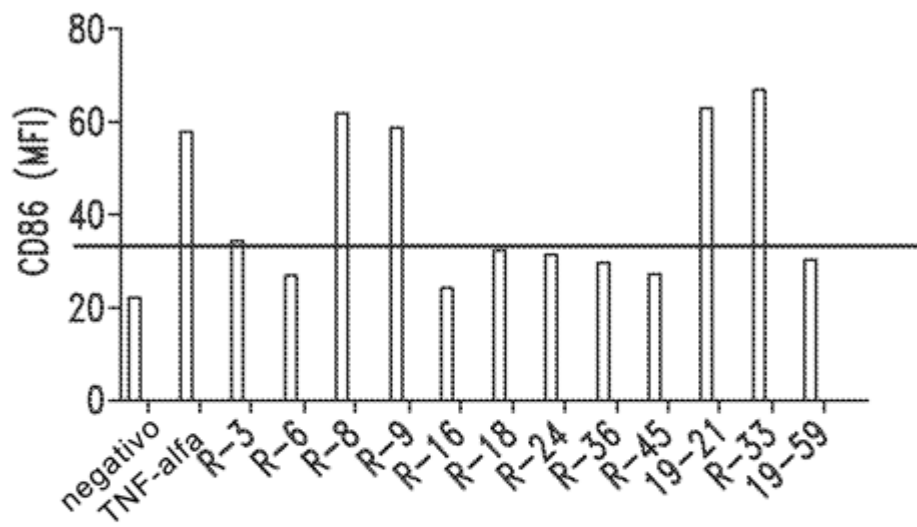


FIG. 1C

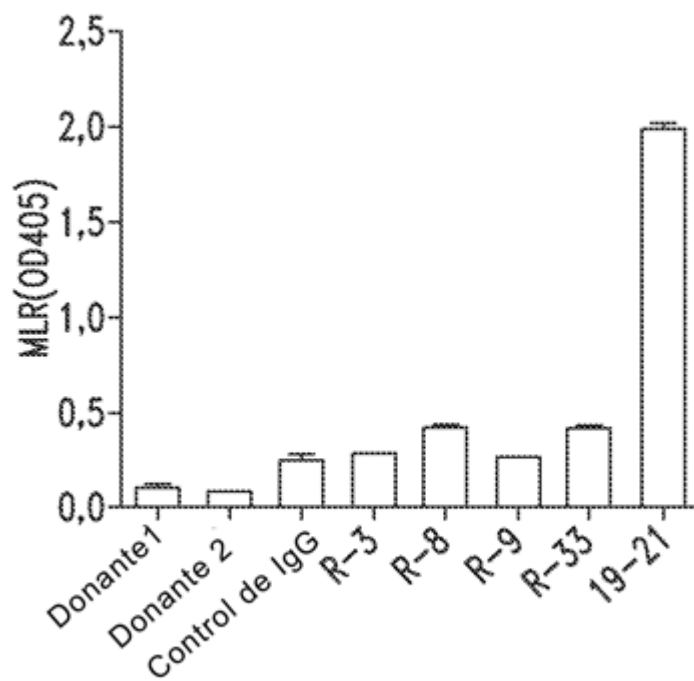


FIG. 1D

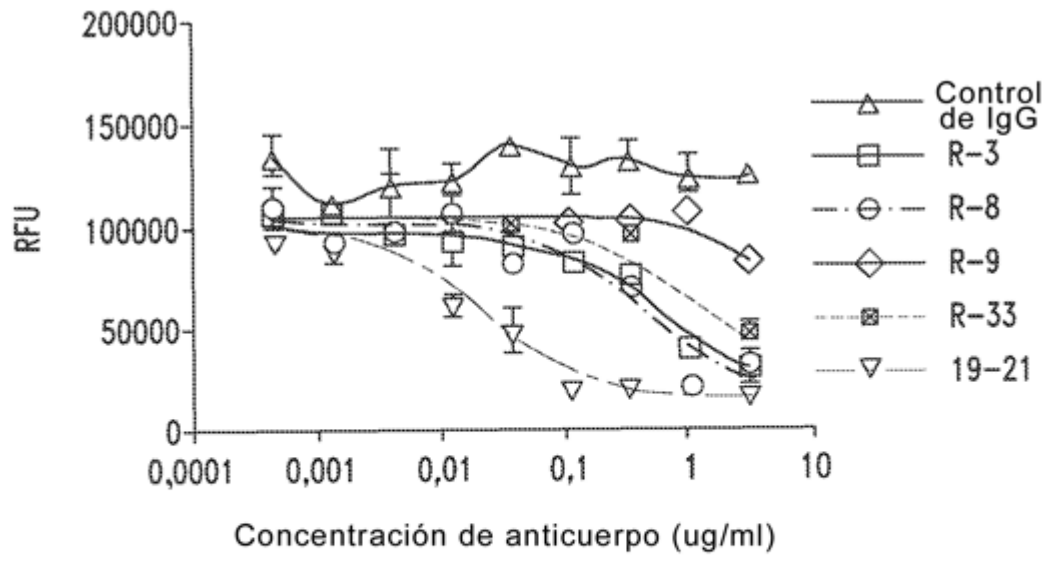


FIG. 2

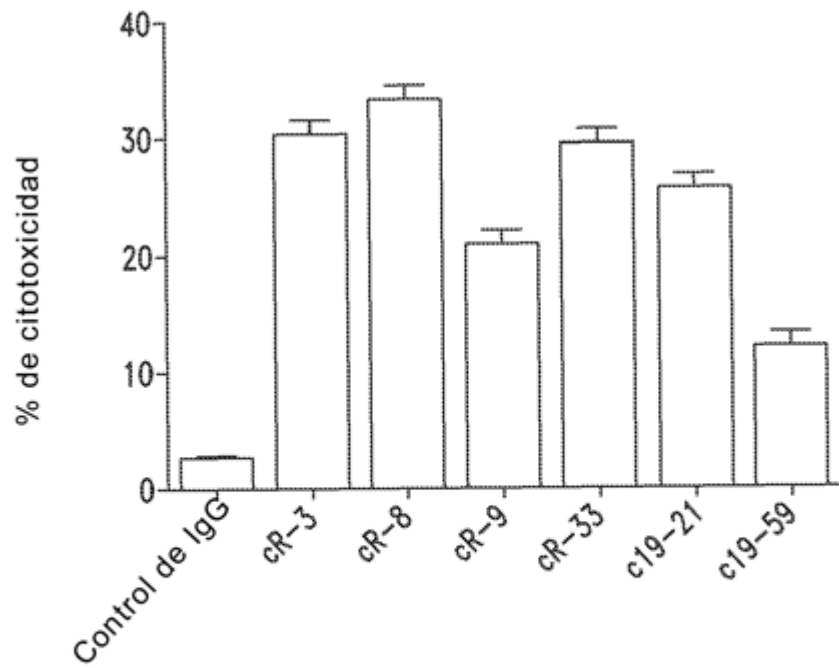


FIG. 3

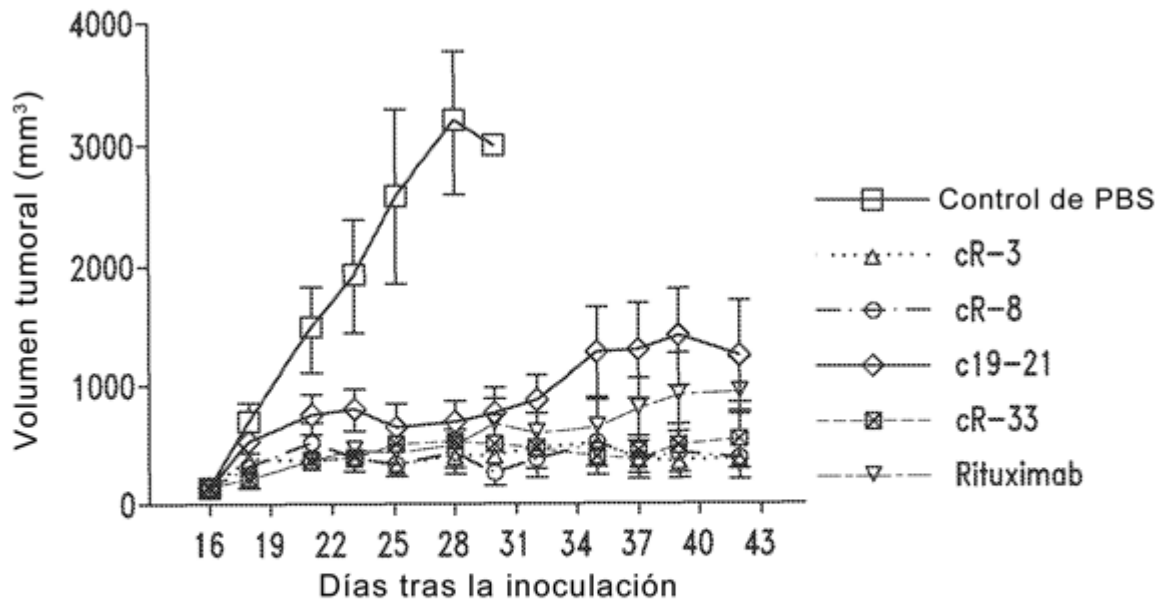


FIG. 4A

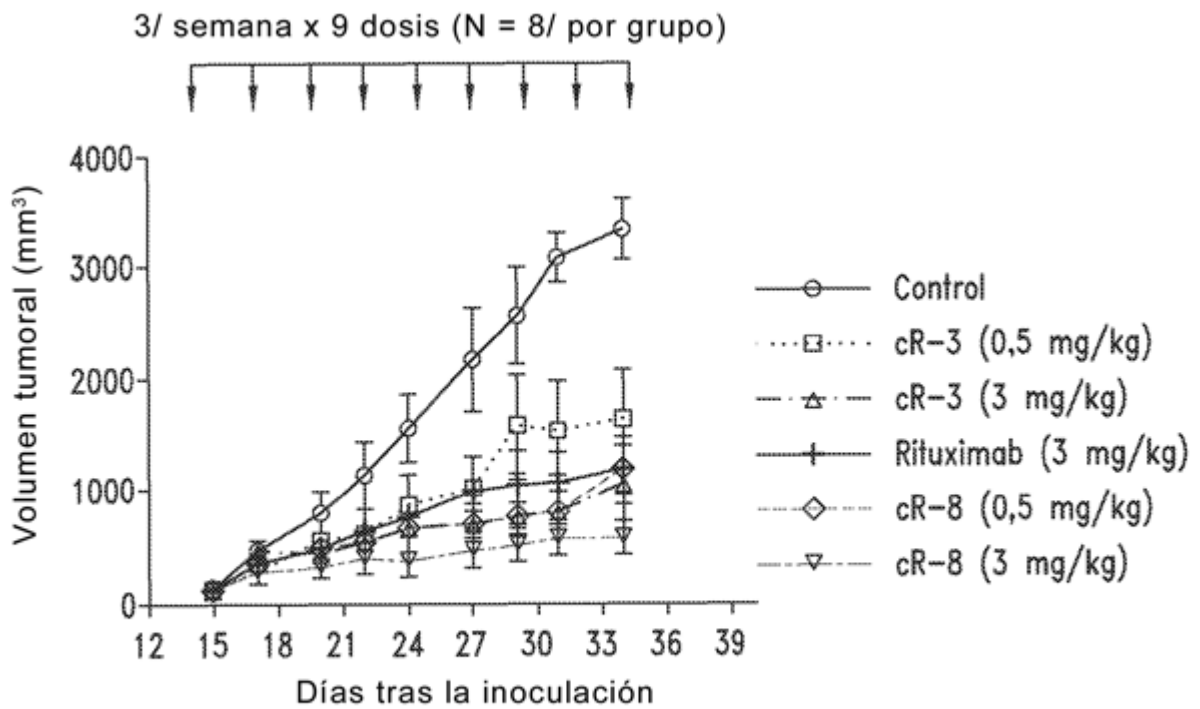
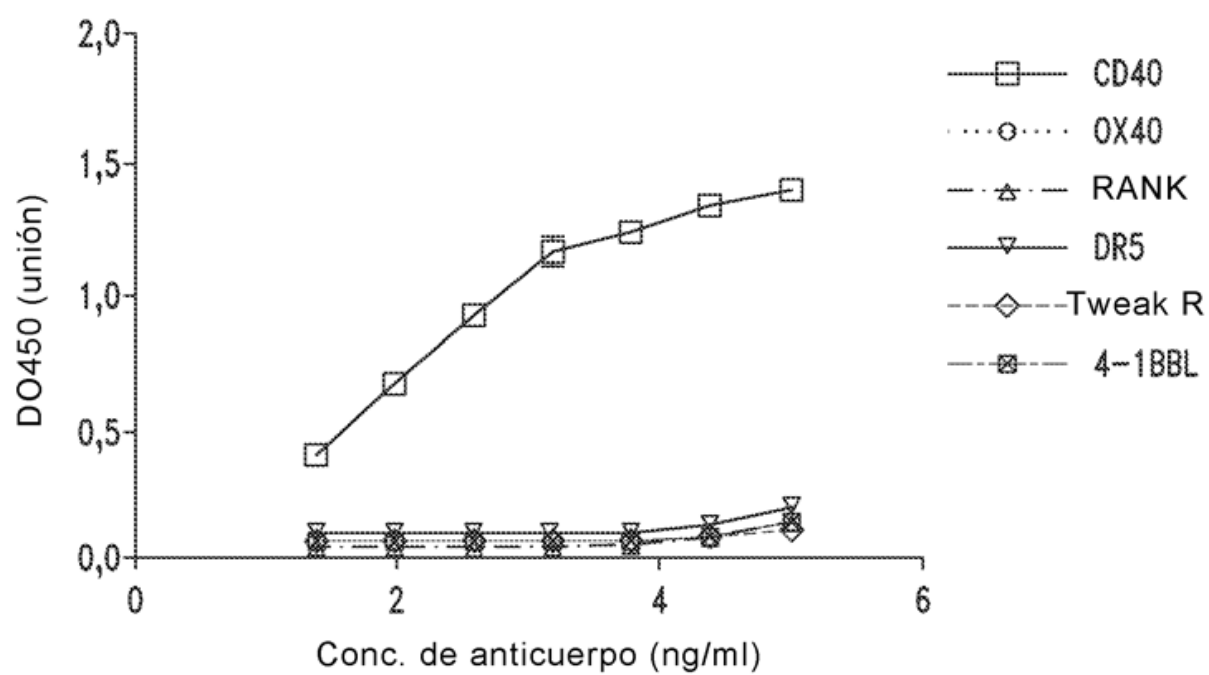


FIG. 4B

*FIG. 5*

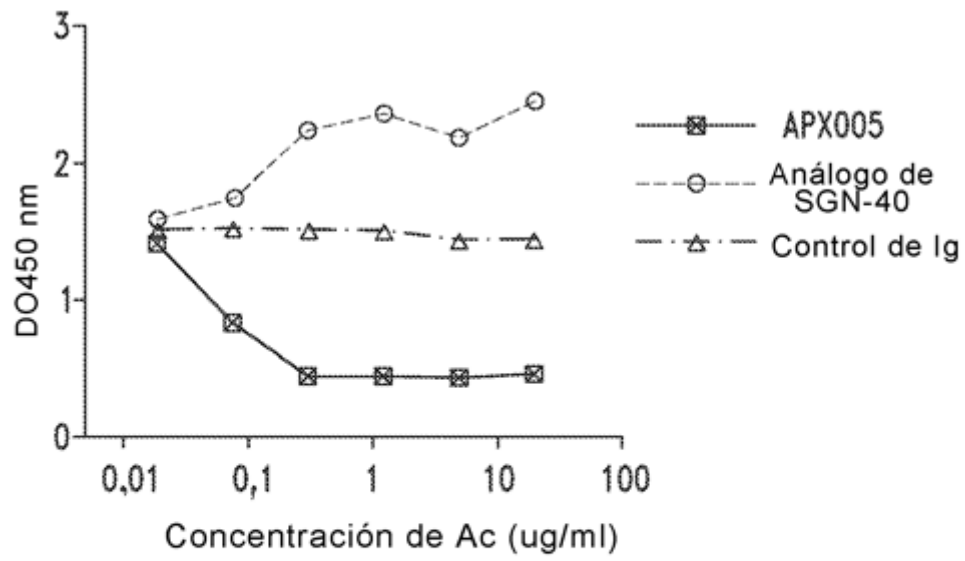


FIG. 6

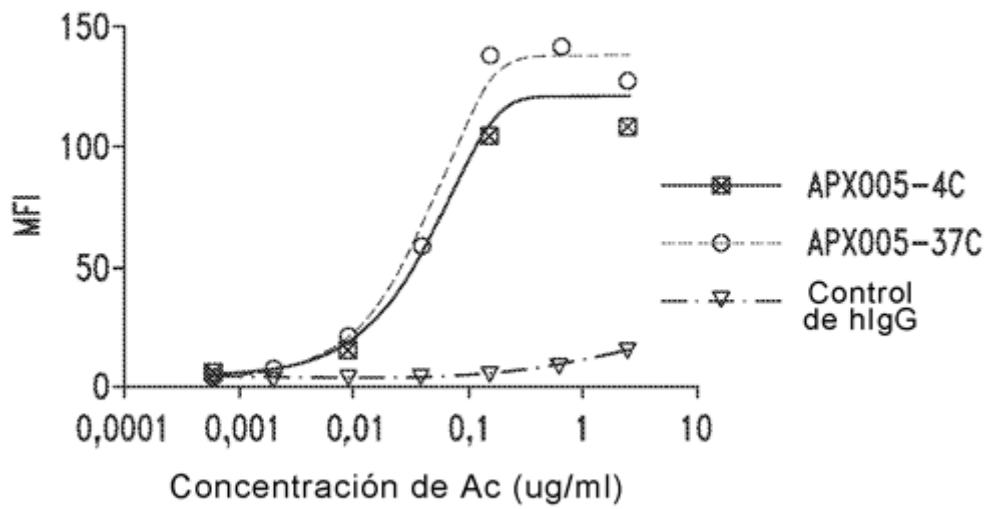


FIG. 7

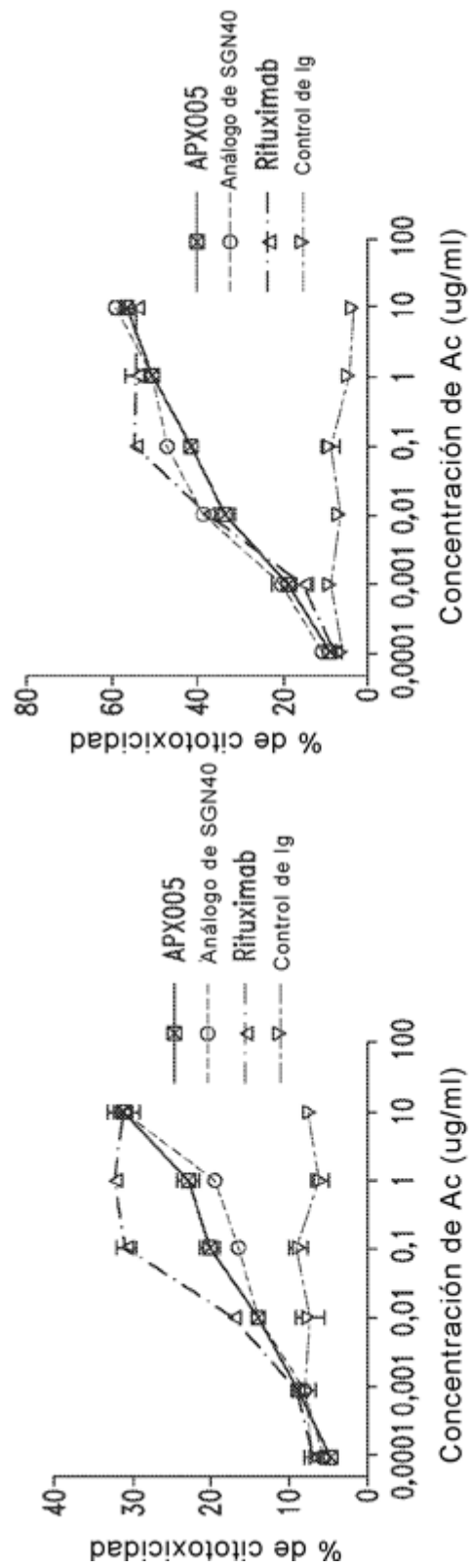


FIG. 8B

FIG. 8A

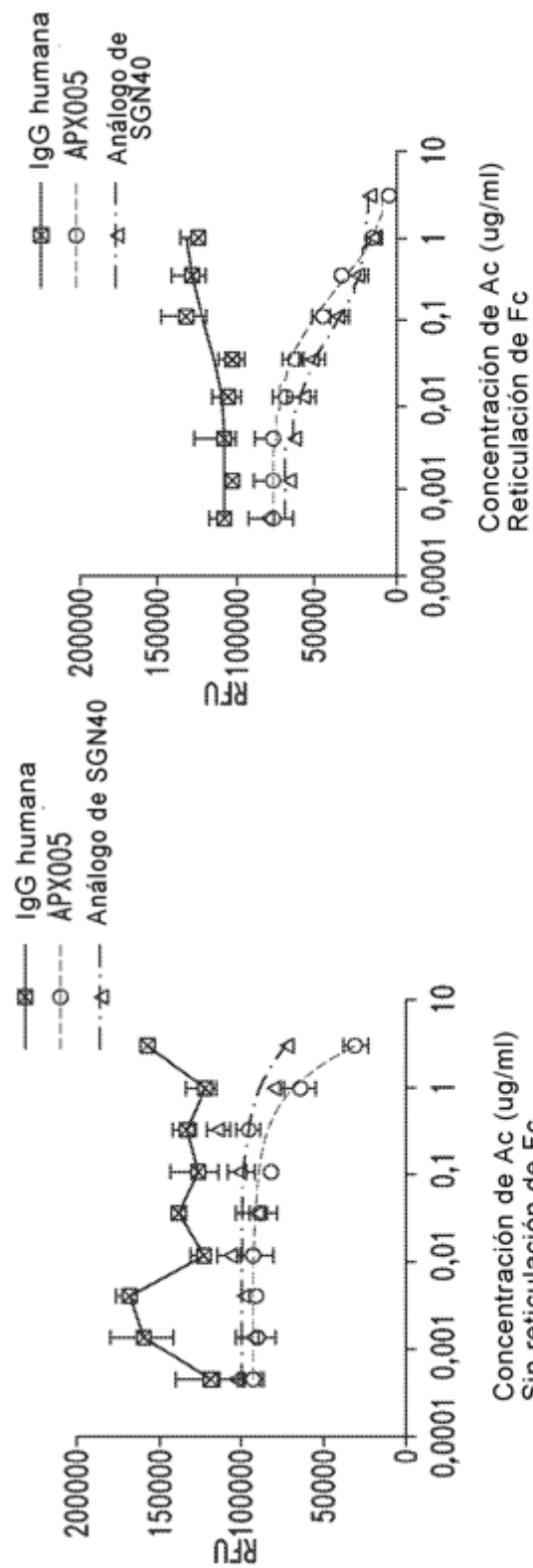
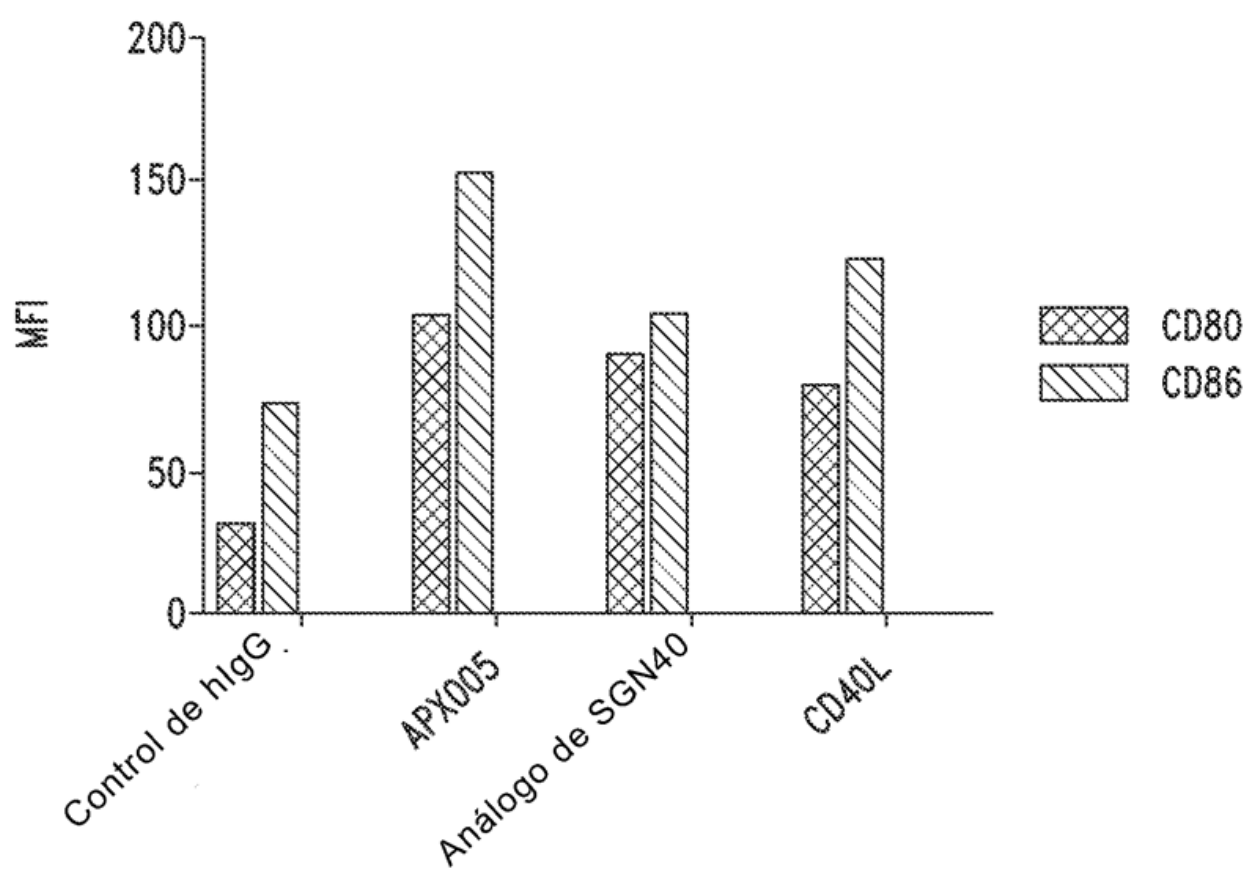


FIG. 9A

FIG. 9B

*FIG. 10*

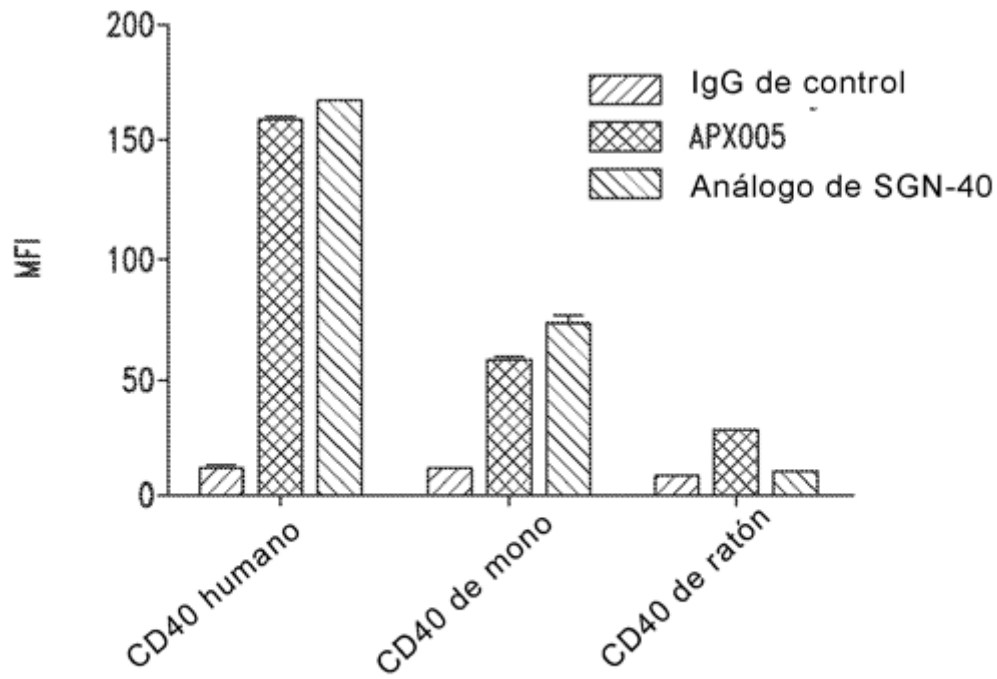


FIG. 11A

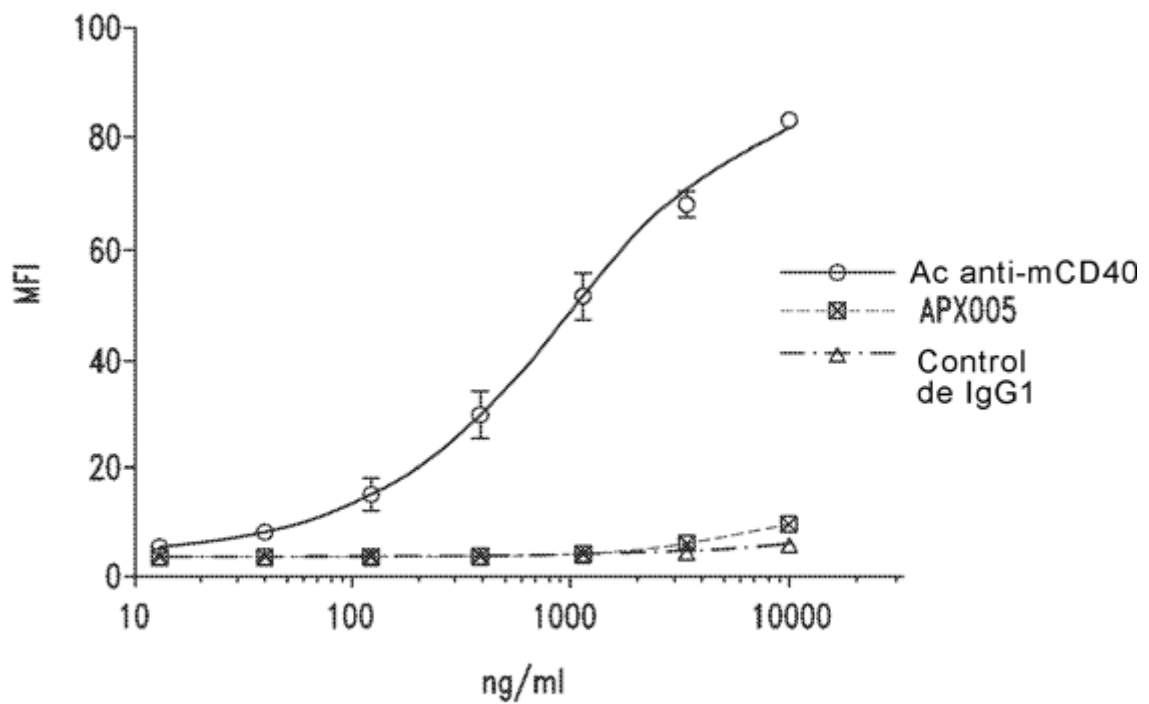


FIG. 11B

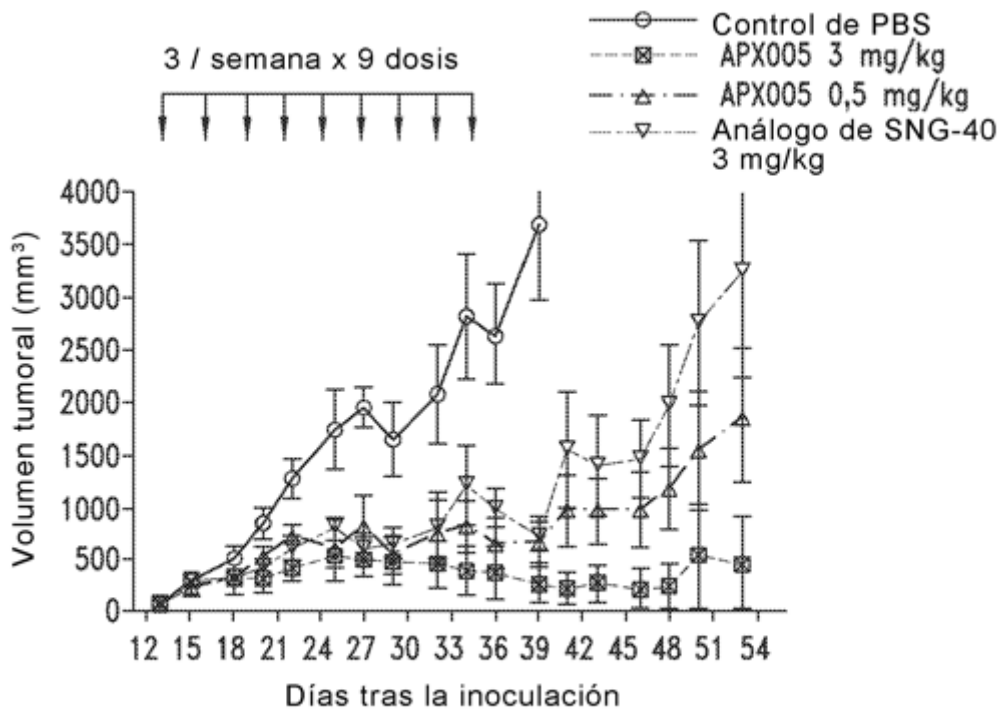


FIG. 12A

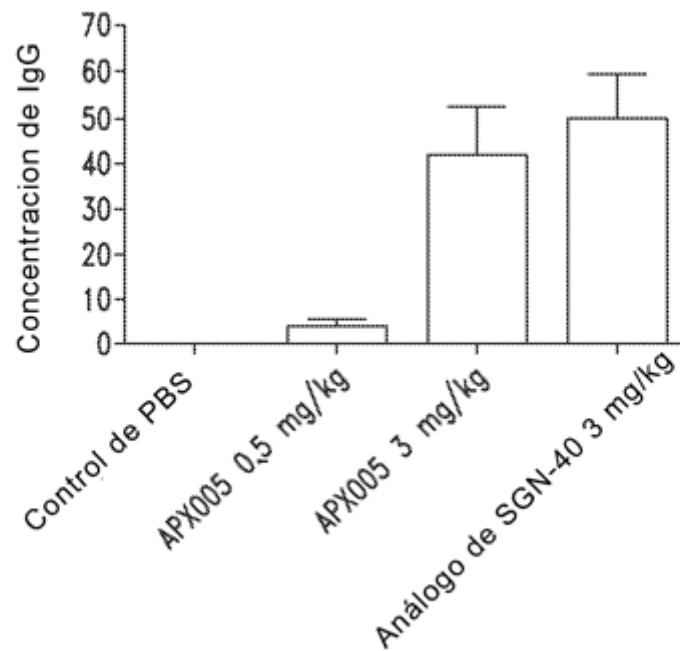


FIG. 12B

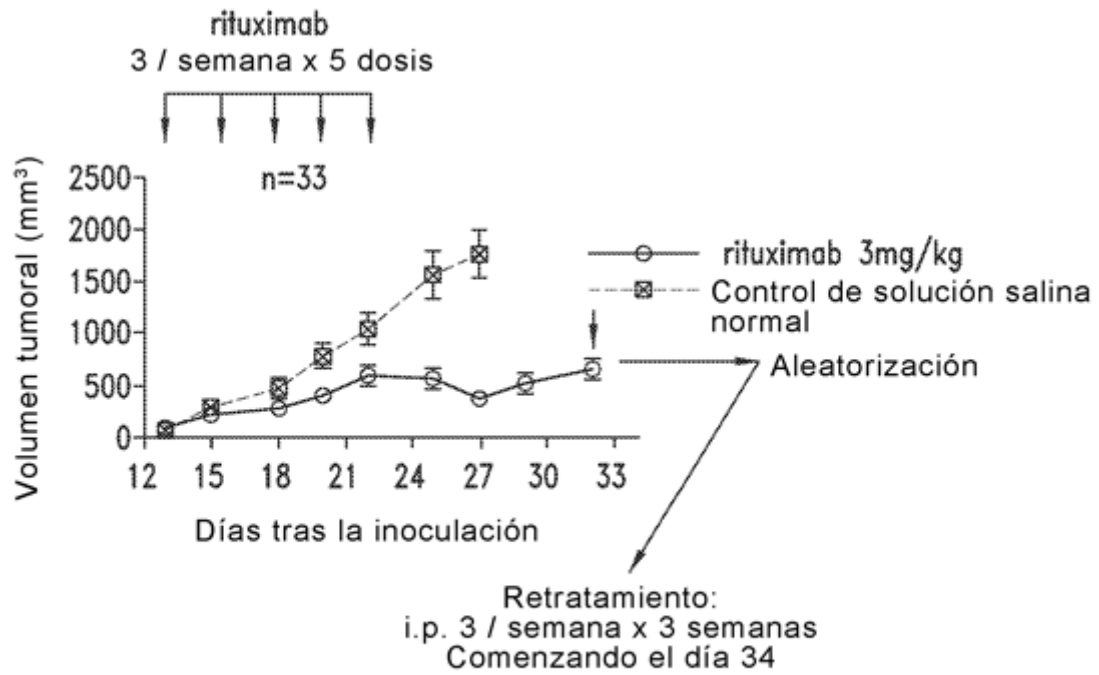


FIG. 13A

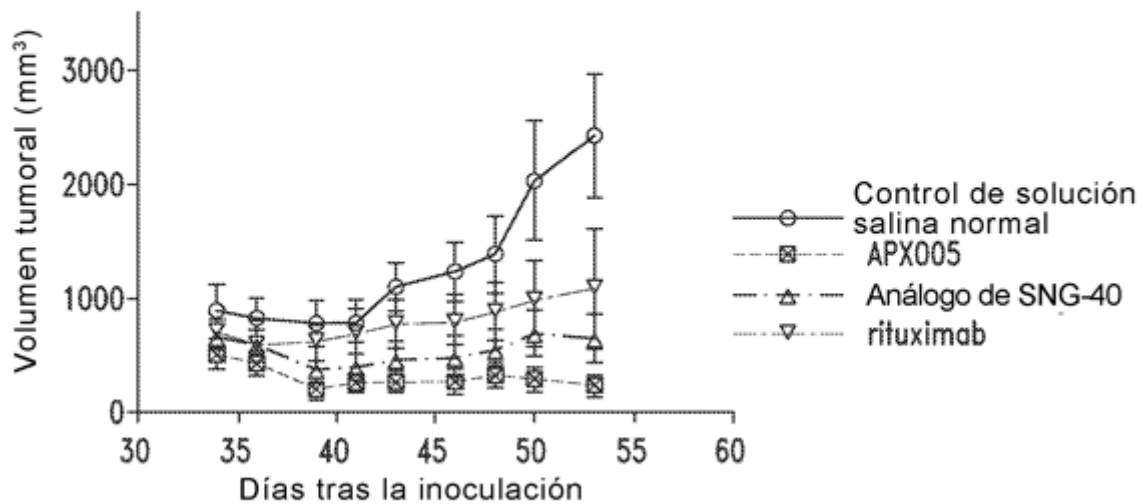


FIG. 13B

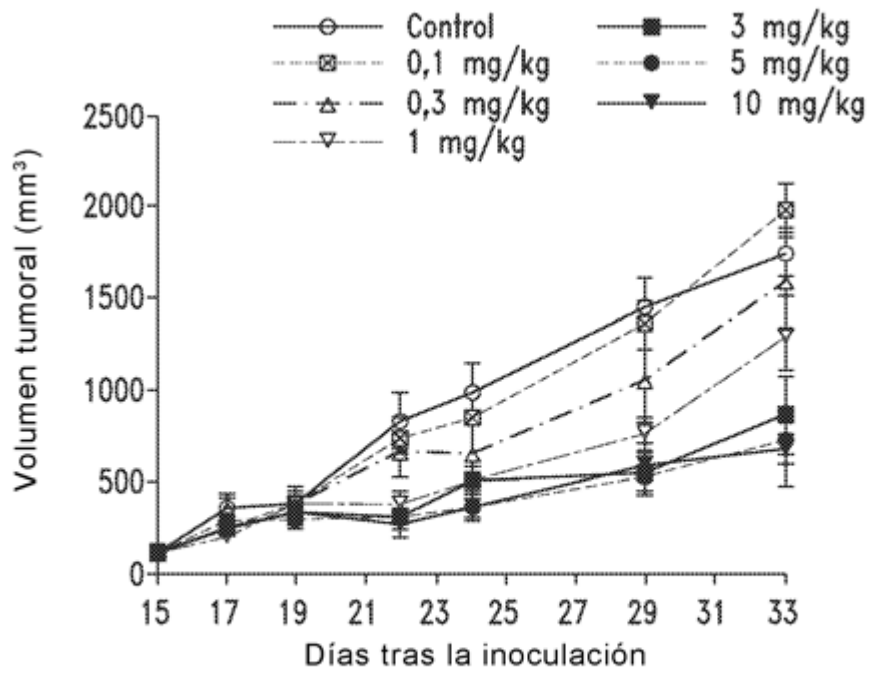


FIG. 14

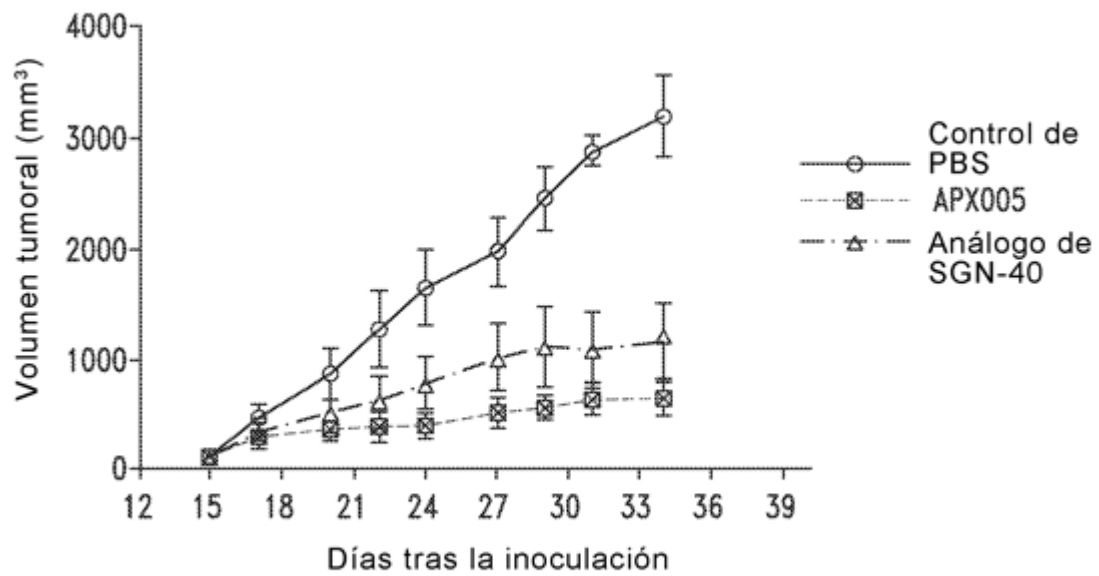


FIG. 15

Cadena pesada de anticuerpo monoclonal de conejo anti-CD40

==CDR1=====

R-2 METGLRWLLLVAVLKGVQC-QQLEESGGGLVKPEGS~~LT~~LTCKANGFSFSAN-YYMC

R-3 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGDLVKPGASLT~~LT~~TCTASGFSFSDS-FWIA

R-5 METGLRWLLLVAVLKGVQC-QEQLEESGGDLVKPGASLT~~LT~~TCKASGF~~DL~~SST-YYMC

R-6 METGLRWLLLVAVLKGVQC-QEQLVESGGGLVQPGGS~~LT~~LTGTASGFSFSSS-YSMC

R-7 METGLRWLLLVAVLKGVQC-QEQLEESGGDLVKPEGS~~LT~~LTCTASGFSFGSG-YYMC

R-8 METGLRGLLLVAVLKGVQC---QSLEESGGDLVKPGASLT~~LT~~TCTASGFSFSS--TYVC

R-9 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGDLVKPGASLT~~LT~~TCTASRFSFSS--TYMC

R-10 METGLRWLLLVAVLKGVQC-QEQLVESGGGLVKPGASLAVTCKASGFSFSRG-YYMC

R-12 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGDLVKPGASLT~~LT~~TCTASGFSFSDS-FWIA

R-16 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGGLVKPGGTLT~~LT~~TCKASGFS~~LN~~Y--YWPC

R-18 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGDLVKPGASLT~~LT~~TCTASGIDFSSY-YYMC

R-20 METGLRWLLLVAVLKGVQC-QEQLEESGGDLVKPEGS~~LT~~LTCTASGFSFGSG-YYMC

R-24 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGDLVKPGASLT~~LT~~TCTASGFSFSRG-YYIC

R-26 METGLRWLLLVAVLKGVQC-QEQLVESGGDLVQPEGS~~LT~~LTSTASGFS~~LS~~SS-YFMC

R-30 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGDLVKPGASLT~~LT~~TCTASGFSFSDS-FWIA

R-33 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGDLVKPGASLT~~LT~~TCTASGFSFSSS-YWIC

FIG. 16A

Cadena pesada de anticuerpo monoclonal de conejo anti-CD40

```

=====CDR2=====

```

R-2 WVRQAPGKGLELIACIYA--SSGSTWYASWAKGRFTISKSTSLNVTVLQMTSLTVAD
R-3 WVRQAPGKGLEWIGCIHAL--SSGSTYYANWARGRFTISKTSST-TVTLQMNSLTAAD
R-5 WVRQAPGKGLEWIGCIY---ATGGTYIASWAKGRFTISKTSPT-TVTLQMPSLTAAD
R-6 WVRQAPGKGLEWIGCIDT--GRGYTYHASGAKGRFTFSKTSST-TVTLQMTSLTAAD
R-7 WVRQAPGKGLEWIGCIYV--GHDSLYYAGWARGRFTISKTSST-TVTLQMTSLTAAD
R-8 WVRQAPGKGLEWIACIYT--GDGTNYSASWAKGRFTISKPSST-TVTLQMTSLTPAD
R-9 WVRQAPGKGLEWIACTYTG--SSGGTYIASWAKGRFTISQTSST-TVTLQLTGLTPAD
R-10 WVRQAPGKGLEWIACIGA--GSGNTYYATWTKGRATISKTSWT-TVSLEMTSLTGAD
R-12 WVRQAPGKGLEWIGCIHAL--SSGSTYYANWARGRFTISKTSST-TVTLQMNSLTAAD
R-16 WVRQAPGKGLEWVACLNGG--DSDTTVYARWAKGRFTISKASST-TVTLQMTSLTAAD
R-18 WVRQAPGKGLEWIGCIYA--GSGSTYYASWAKGRFTISKTSST-TVTLQMTSLTAAD
R-20 WVRQAPGKGLEWIGCIYV--GHDSLYYAGWARGRFTISKTSST-TVTLQMTSLTAAD
R-24 WVRQAPGKGLEWIACIGA--GSGGTYFASWAKGRFSISRTSST-TVTLQMTSLTAAD
R-26 WVRQAPGKGLEWIACISAG--SSGHTYYASWAKGRFTVSKTSST-TVTLQMTSLTAAD
R-30 WVRQAPGKGLEWIGCIHAL--SSGSTYYANWARGRFTISKTSST-TVTLQMNSLTAAD
R-33 WVRQAPGKGLEWIACINTG--SSVTTVYARWAKGRFTISKASST-TVTLQMTSLTAAD

FIG. 16B

Cadena pesada de anticuerpo monoclonal de conejo anti-CD40

=====CDR3=====

R-2	TATYFCAR <u>SGGYAAY</u> -----DLWGPGTLVTVSS
R-3	TATYFCAR <u>SYAGYADYNVATGL</u> ---NLWGPGTLVTVSS
R-5	TATYFCAR <u>DIVGDNIYYF</u> -----NEWGPGTLVTVSS
R-6	TATYFCAR <u>SSYVRYDNRNYGF</u> ----NLWGPGTLVTVSS
R-7	TATYFCAR <u>GASITNSYF</u> -----SLWGPGTLVTVSS
R-8	TATYFCAR <u>PDITYGFAI</u> -----NEWGPGTLVTVSS
R-9	TATYFCAR <u>PDVGFDFAI</u> -----NEWGPGTLVTVSS
R-10	TATYFCAR <u>EDPGNDDYGYAD</u> ----NLWGPGTLVTVSS
R-12	TATYFCAR <u>SYAGYADYNVATGL</u> ---NLWGPGTLVTVSS
R-16	TATYFCAR <u>YIIPGYHF</u> -----NLWGPGTLVTVSS
R-18	TATYFCAR <u>SGYNDGSYY</u> -----NLWGPGTLVTVSS
R-20	TATYFCAR <u>GASITNSYF</u> -----SLWGPGTLVTVSS
R-24	TATYFCAR <u>EDAGNDDYGYAR</u> ----NLWGPGTLVTVSS
R-26	TATYFCAR <u>ASADVGDY</u> -----SLWGPGTLVTVSS
R-30	TATYFCAR <u>SYAGYADYNVATGL</u> ---NLWGPGTLVTVSS
R-33	TATYFCAR <u>YIIPGYNF</u> -----NLWGPGTLVTVSS

FIG. 16C

Cadena pesada de anticuerpo monoclonal de conejo anti-CD40

==CDR1====

R-35 METGLRWLLLVAVLKGVC--QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASSGFSFSGT-YWIC

R-36 METGLRWLLLVAVLKGVC--QQQLVESGGGLVKPGASLTLTCKASSGFSFSST-YWIC

19-21 METGLRWLLLVAVLKGVC--QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFDLSS--NAMN

19-35 METGLRWLLLVAVLKGVC--QSLEESGGRLITPGTPLTLTCTVSGFSLSS--YAVN

19-41 METGLRWLLLVAVLKGVC--QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLST--YDMT

19-45 METGLRWLLLVAVLKGVC--QSVEESGGRLVTPGTPLTLNCTVSGFSLSS--YDMN

19-57 METGLRWLLLVAVLKGVS--QSVEESGGRLITPGTPLTLTCTISGFSLS--YAVD

19-59 METGLRWLLLVAVLKGVC--QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSL--DYVMR

FIG. 16D

Cadena pesada de anticuerpo monoclonal de conejo anti-CD40

=====CDR2=====

R-35 WVRQAPGKGLEWIACIYAG-ASGNSYYANWAQGRFIISKRSST-AVTLQMTSLTAAD
R-36 WVRQAPGKGLEWIGCINSD-DSGNTVYANWAKGRFTISKASST-TVTLQMTSLTAAD
19-21 WVRQAPGKGLEWIGYITIS---GSAGYASWAKGRFTISKTSTT--VDLKISSPTTED
19-35 WVRQAPGKGLEYIGLIATG---GGTFYTNWARGRLTISKTSTT--VDLKMPSPQTED
19-41 WVRQAPGKGLEWLGLINTI---GSAYYASWASGRFTISKTSTS--VTLKMTSPPTED
19-45 WVRQAPGKGLEWIGVIWNN---GEIFYASWAKGRFTISKTSTT--VDLKITSPSTED
19-57 WVRQAPGKGLEYIGIATG---GGTYTNWAKGRFTISKTSTT--VDLKMTSPQPED
19-59 WVRQAPGKGLEWIGVISSA---GNTYYATWAKDRFTISKTSTT--VDLRIASPTTED

FIG. 16E

Cadena pesada de anticuerpo monoclonal de conejo anti-CD40

=====CDR3=====

R-35	TATYFCARS <u>YTGADYNVATGL</u> ---NLWGPGTLVTVSS
R-36	TATYFCARY <u>PIPGYHF</u> -----NLWGPGTLVTVSS
19-21	TATYFCARG <u>YNTMA</u> -----IWGPGTLVTVSS
19-35	TATYFCVRG <u>YPGSSDF</u> -----NIWGPGTLVTVSS
19-41	TATYFCVRG <u>VPGYSSSF</u> -----NIWGPGTLVTVSS
19-45	TATYFCAGD <u>ADGGVVS</u> YF-----HVGPGTLVTVSS
19-57	TATYFCVRG <u>YPGSSDF</u> -----NIWGPGTLVTVSS
19-59	TATYFCARI <u>WRPDDPTNS</u> -----DIWGPGTLVTVSS

FIG. 16F

Cadena ligera de anticuerpo monoclonal de conejo anti-CD40

R-2 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATF-AAVLTQTPSPVSAAVGGTVSISC

R-3 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARC-DVVMTPSSASAAGGTVTTKC

R-5 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARC-ALVMTQTPSSVSAAGGTVTINC

R-6 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARCADIVMTQTPASVEAAGGTTITINC

R-7 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGVTF-AIEMTPPFSVSEPVGGTVTIKC

R-8 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARSADIVMTQTPSSASEPVGGTVTIKC

R-9 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARCADIVMTQTPSSASEPVGGTVTIKC

R-10 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARCADIVMTQTPSSVSAAGGTVTIKC

R-12 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARC-DVVMTPSSASAAGGTVTIKC

R-16 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARC-AYDMTPASVSAAGDVTIIC

R-18 MDTRAPPQLLGLLLLWLPGARCADIVMTQTPSSVEAAGGTVTIKC

R-20 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGVTF-AIEMTPPFSVSEPVGGTVTIKC

R-24 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARCADIVMTQTPASVSAAGGTVTINC

R-26 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARC-DVMMTPASVSAPVGGTVTIKC

R-30 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARC-DVVMTPSSASAAGGTVTIKC

R-33 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARC-AYDMTPASVEVAVGGTVTINC

FIG. 16G

Cadena ligera de anticuerpo monoclonal de conejo anti-CD40

====CDR1=====

==CDR2==

R-2 QSSKSVYNN----NWLSWYQQKPGQPPKLLIYRASTLASGVPSRFRGSGSGTEFTLT

R-3 QASQSIG-----SYLAWYQQKPGQRPKLLIYAASNLASGVPSRFRKGSRSGTEYTLT

R-5 QASQTIS-----NELSWYQQKPGQPPKLLIYLASTLASGVPSRFRKGSSGTQFTLT

R-6 QASESIS-----SWLSWYQQKPGQRPKLLIYTSNLASGVPSRFRKGSGAGTDFTLT

R-7 QASEDIF-----SNLGWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGVPSRFRKGSSGTDFTLT

R-8 QASQSIG-----SRLAWYQQKPGQPPKLLIYRASTLASGVPSRFRKGSSGTEFTLT

R-9 QASQSIG-----SRLAWYQQKPGQPPKLLIYRASTLASGVSSRFRKGSSGTQFTLT

R-10 QASETIY-----TLLAWYQQKPGQPPKLLIYRASTLESGVPSRFRQSGSGTEFTLT

R-12 QASQSIG-----SYLAWYQQKPGQRPKLLIYAASNLASGVPSRFRKGSRSRGTEYTLT

R-16 QASQSIG-----SYLYWYQQKPGQPPKLLIYQASKLASGVPSRFRKGSSGTEYTLT

R-18 QASQSIY-----TWLAWYQQKPGQPPKLLIYKASTLASGVPSRFRKGSSGTDYTLT

R-20 QASEDIF-----SNLGWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGVPSRFRKGSSGTDFTLT

R-24 QASESAY-----TLLAWYQQKPGQPPKLLIYGASILESGVPSRFRKGSSGTDFTLT

R-26 QASQSIG-----TYLAWYQQKPGQPPKLLIYYASTLASGVSSRFEGSRSVTEYTLT

R-30 QASQSIG-----SYLAWYQQKPGQRPKLLIYAASNLASGVPSRFRKGSRSRGTEYTLT

R-33 QASQSIG-----SYLYWYQQKPGQPPKLLIYDASKLASGVPSRFRKGSSGTQFTLT

FIG. 16H

Cadena ligera de anticuerpo monoclonal de conejo anti-CD40

=====CDR3=====

R-2 ISDVVCDDAATYYCCAGYESVNTDG----HAFGGGTEVVVK

R-3 ISGVQREDAATYYCCLGSFTGSD-----TTFGGGTELEIL

R-5 ISDLECADAATYYCQQGYTYSSVD---NVFGGGTEVVVK

R-6 ISDLECADAATYYCQSNYGSSSSTY--YGFGGGTEVVVK

R-7 INDLECDDAATYYCQSAYYSSSY----LAFGGGTEVVVK

R-8 ISDLECADAATYYCQCTGYGIS-----WPIGGGTEVVVK

R-9 ISDLECADAATYYCQCTGYTIS-----WPFGGGTEVVVK

R-10 ISDLECADAATYYCQSHYFDSSSGYG-NTFGGGTEVVVK

R-12 ISGVQREDAATYYCCLGSFTGSD-----TTFGGGTELEIL

R-16 ISDLECADVATYYCQQGYSHINVD---NIFGGGFQVVVK

R-18 ISDLECDDAATYYCQRYSWNGSYG---VSFGGGTEVVVR

R-20 INDLECDDAATYYCQSAYYSSSY----LAFGGGTEVVVK

R-24 ISDLECADAATYYCQSHYFGSSSGYA-NTFGGGTEVVVK

R-26 ISDLECADAATYYCQSTYYGNG-----HPFGGGTEVVVK

R-30 ISGVQREDAATYYCCLGSFTGSD-----TTFGGGTELEIL

R-33 ITGVECADAATYYCQQGYSHINVD---NIFGGGTEVVVK

FIG. 16I

Cadena ligera de anticuerpo monoclonal de conejo anti-CD40

R-35 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARC-ALVMTQTPSSTSAAVGGTVTIKC
R-36 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARC-AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKC
19-21 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATF-AQVLTQTPSPVSAPVGGTVTINC
19-35 ALAPGARC-AVVLTQTPASVSAAVGGTVSISC
19-41 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATF-AIVMTQTPSSKSVAVGDTVINC
19-45 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARC-AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKC
19-57 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARC-AVVLTQTPASVSAAVGGTVSISC
19-59 MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARC-DVVMTQTPSSTSAAVGGTVTIKC

FIG. 16J

Cadena ligera de anticuerpo monoclonal de conejo anti-CD40

	====CDR1=====	==CDR2=
R-35	<u>QASQSIG</u> -----SYLAWYQQKPGQRPKLLIYAASN <u>LASGDPSRFSASRSGTEY</u>	
R-36	<u>QASQNIY</u> -----GYLFWYQQKPGQPPNLLIAEASKLPSGVPSRFRKGSGSGTEY	
19-21	<u>QSSQNVLIN</u> ----NRLAWYQQKPGQPPKLLIYDASKLASGVPSRFRKGSGSGTQF	
19-35	<u>QSSKSVYNK</u> ----HHLAWLQQKPGQPPKLLIYYASTLASGVPSRFRGSGSGTQF	
19-41	<u>QASESVDSN</u> ----KRLAWYQQKPGQPPKLLIYTASTLASGVPSRFRKGSGSGTEF	
19-45	<u>QASQTIY</u> -----TYLAWYLQKPGQPPKLLIYEASKLASGVSSRFEKGSGSGTQF	
19-57	<u>QSSKSVYNK</u> ----NHLAWLQQKPGQPPKLLIYYTSTPASGVPSRFRGSGSGTQL	
19-59	<u>QASESIS</u> -----SSLAWYQQKPGQPPKLLIYYASDLASGVPSRFSGSRSGTEY	

FIG. 16K

Cadena ligera de anticuerpo monoclonal de conejo anti-CD40

====CDR3====

R-35 TLTISGVQREDAATYYCCLGSFTGSD-----TTFGGGTELEIL
R-36 SLTISGVECADEAATYYCQQSYSHINVD---NIFGGGTEVVVK
19-21 TLTISGVQCDDAATYYCQAGYSSGDG----NAFGGGTEVVVK
19-35 TLTISDVQCDDAATYYCCAGGYPSDSD----NTFGGGTEVVVE
19-41 TLTISDVVCDDAATYYCCAGYKATTTDA---SAFGGGTEVVVK
19-45 TLTISGVQCDDAATYYCQQGYNSRHVD---NVFGGGTEVVVK
19-57 TLTISDVQCDDAATYYCCAGGYNSDSD----NTFGGGTEVVVE
19-59 TLTISGVQREDAATYYCCLGGYATAAYR---TAFGGGTELEILC

FIG. 16L

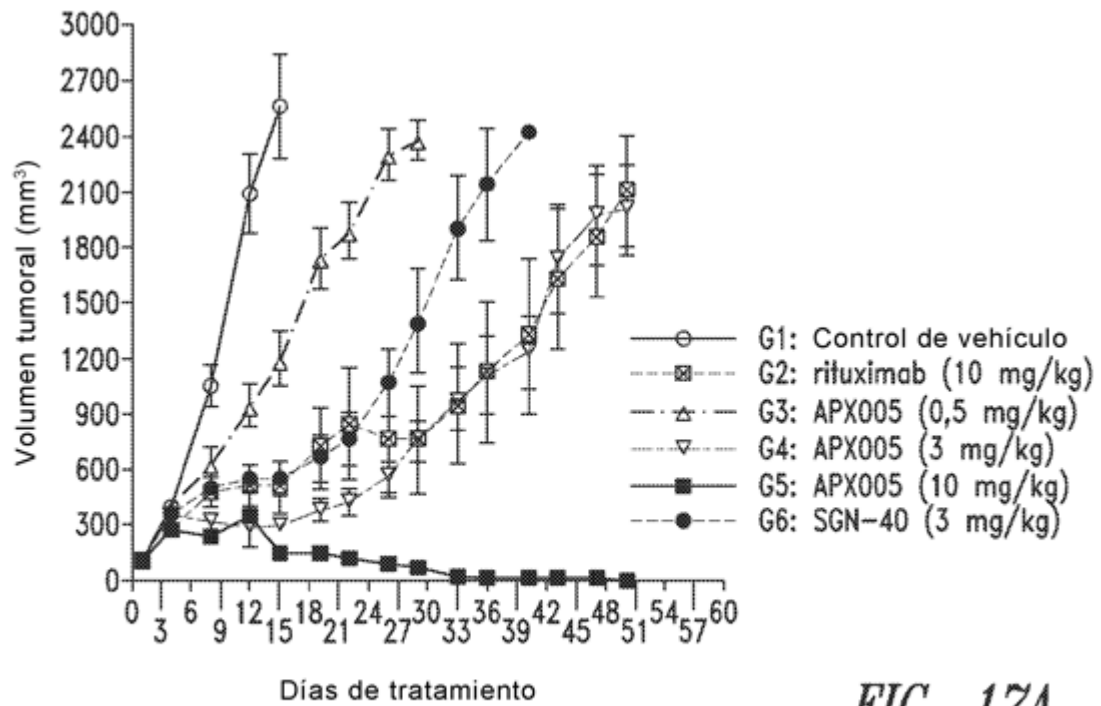


FIG. 17A

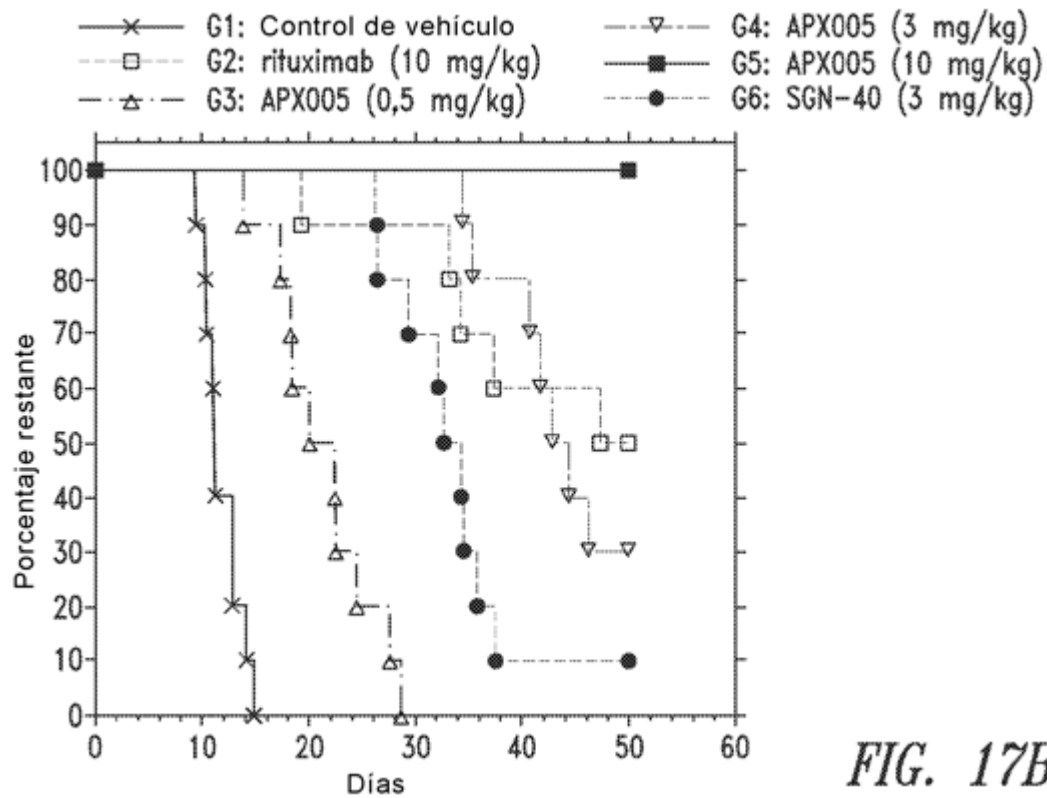


FIG. 17B

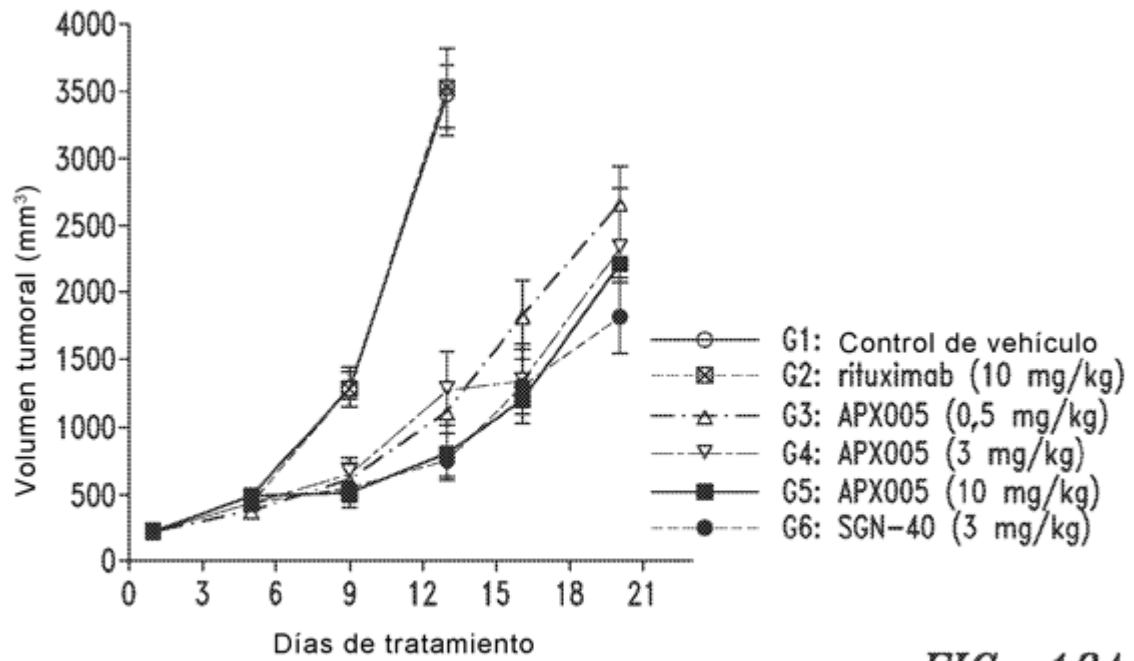


FIG. 18A

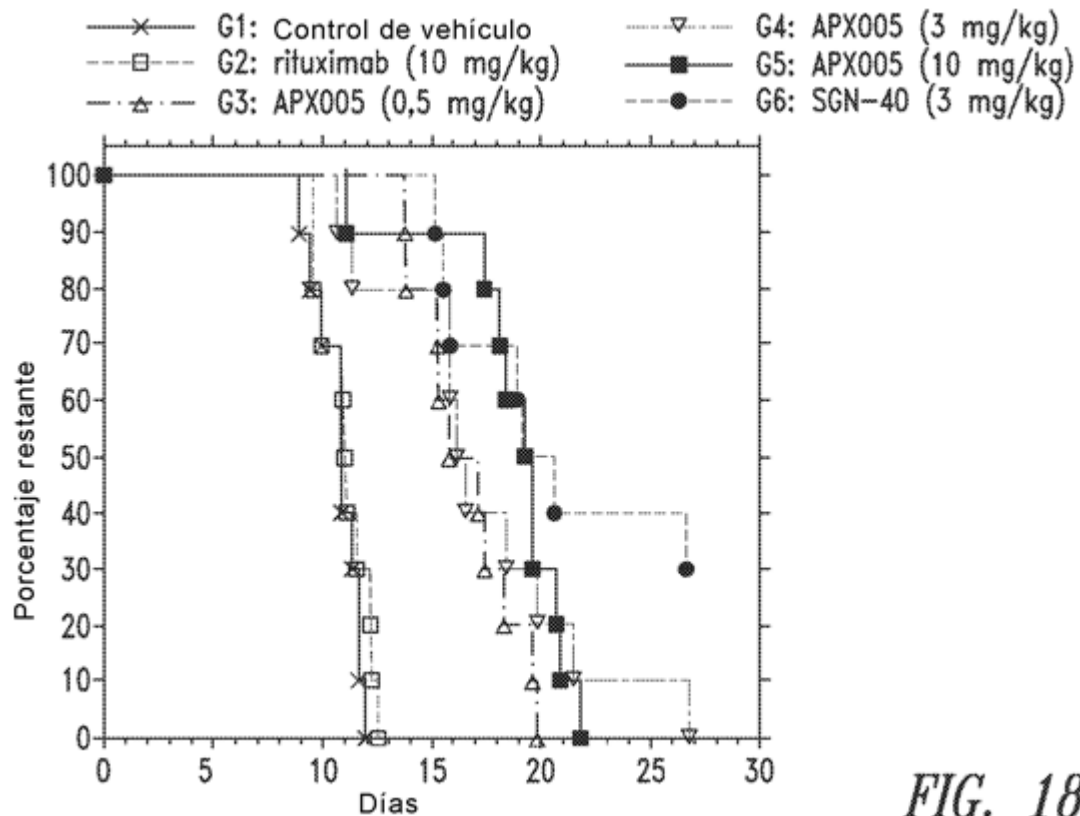


FIG. 18B