

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 859**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.03.2008 PCT/US2008/003735**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2008 WO08118356**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2008 E 08742182 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 2125894**

54 Título: **Proteínas de unión, incluyendo anticuerpos, derivados de anticuerpo y fragmentos de anticuerpo, que se unen específicamente a CD154 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**22.03.2007 US 919816 P
22.03.2007 US 919938 P
27.03.2007 US 920495 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.05.2019

73 Titular/es:

**BIOGEN MA INC. (50.0%)
 225 Binney Street
 Cambridge, MA 02142, US y
 UCB BIOPHARMA SPRL (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BURKLY, LINDA C.;
FERRANT-ORGETTAS, JANINE L.;
GARBER, ELLEN A.;
HSU, YEN-MING;
SU, LIHE;
TAYLOR, FREDERICK R.;
ADAMS, RALPH;
BROWN, DEREK THOMAS;
POPPLEWELL, ANDREW GEORGE;
ROBINSON, MARTYN KIM;
SHOCK, ANTHONY y
TYSON, KERRY LOUISE**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 713 859 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

Proteínas de unión, incluyendo anticuerpos, derivados de anticuerpo y fragmentos de anticuerpo, que se unen específicamente a CD154 y usos de los mismos

5 **Campo técnico de la invención**

Esta divulgación proporciona generalmente proteínas de unión, incluyendo anticuerpos, derivados de anticuerpo y fragmentos de anticuerpo, que específicamente se unen a una proteína CD154 (CD40L). En particular, la invención se refiere a un anticuerpo anti-CD 154 o un fragmento de unión a CD 154 del mismo, que comprende: (a) una secuencia del dominio VH de acuerdo con SEQ ID NO: 1 de la Figura 5; y (b) una secuencia de dominio VL de acuerdo con SEQ ID NO: 2 de la Figura 6. También se desvela un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo quimérico, humanizado o completamente humano que se une específicamente a un epítipo al cual se une específicamente un fragmento Fab humanizado que comprende una secuencia de cadena pesada variable de acuerdo con SEQ ID NO: 1 y comprende una secuencia de cadena ligera variable de acuerdo con SEQ ID NO: 2. Las proteínas de unión a CD154 de esta divulgación pueden producir una función efectora reducida con relación a un segundo anticuerpo anti-CD154. Las proteínas de unión a CD154 de esta divulgación son útiles en métodos de diagnóstico y terapéuticos, tales como en el tratamiento y la prevención de enfermedades que incluyen aquellas que implican respuestas inmunes indeseables que están mediadas por interacciones CD154-CD40.

20 **Antecedentes de la invención**

La generación de inmunidad humoral y mediada por células está orquestada por la interacción de células T auxiliares activadas con células presentadoras de antígeno ("APC") y células T efectoras. La activación de las células T auxiliares no solamente depende de la interacción del receptor de la célula T específico del antígeno ("TCR") con su ligando péptido-MHC afín, sino que también requiere la unión coordinada y la activación a través de un número de moléculas de adhesión celular y coestimuladoras. Véase, por ejemplo, Salazar-Fontana, L. I., y B. E. Bierer (2001) *Curr. Opin. Hemat.* 8:5.

30 Una molécula coestimuladora crítica es CD154, una proteína de transmembrana de Tipo II que se expresa en la superficie de las células T CD4⁺ en una forma temporalmente restringida, dependiente de la activación. CD154 también se expresa, después de la activación, en un subconjunto de células T CD8⁺, basófilos, mastocitos, eosinófilos, linfocitos citolíticos naturales (células NK), células B, macrófagos, células dendríticas y plaquetas. El contra receptor de CD154, CD40, es una proteína de membrana de Tipo I que está constitutiva y ampliamente expresada en la superficie de muchos tipos celulares, incluyendo APC. Véase, por ejemplo, Foy, T. M. et al., (1996) *Ann. Rev. Immunol.* 14:591.

La señalización a través de CD40 mediante CD154 inicia una cascada de eventos que da como resultado la activación de las células que llevan el receptor CD40 y el cebado de la célula T CD4⁺. Más específicamente, la unión de CD154 a CD40 promueve la diferenciación de las células B en células secretoras de anticuerpo y células B de memoria. Véase, por ejemplo, Burkly, L. C. (2001) *In Adv. Exp. Med. Bio.*, Vol. 489. D.M. Monroe et al, eds. Kluwer Academic/Plenum Publishers, p. 135 (en lo sucesivo "Burkly, *supra*"). Adicionalmente, la interacción CD154-CD40 promueve la inmunidad mediada por células a través de la activación de macrófagos y células dendríticas y la generación de células aniquiladoras naturales y linfocitos C citotóxicos. Véase, por ejemplo Burkly, *ibid*.

45 El papel pivotal de CD154 en la regulación de la función tanto de la respuesta inmune humoral como de la mediada por células ha provocado un gran interés en el uso de inhibidores de esta trayectoria para la inmunomodulación terapéutica. Es decir, los anticuerpos anti-CD154 han demostrado ser beneficiosos en una amplia diversidad de modelos de respuesta inmune a otras proteínas terapéuticas o terapia génica, alérgenos, autoinmunidad y trasplante. Véase, por ejemplo, el documento US 5.474.771; Burkly, *supra*.

50 La interacción CD40-CD154 ha demostrado ser importante en varias enfermedades autoinmunes experimentalmente inducidas en donde se ha demostrado que la inducción de la enfermedad puede bloquearse con antagonistas de CD154 en el momento de la administración del antígeno (Burkly, *supra*). El bloqueo de la enfermedad utilizando antagonistas anti-CD154 también se ha visto en modelos de animales de enfermedad autoinmune espontánea. Véase, Burkly, *supra*.

60 Actualmente existe una necesidad de anticuerpos anti-CD154 mejorados con afinidades de unión mayores y menos efectos secundarios indeseados. Las "funciones efectoras" aumentadas tales como la citotoxicidad directa, la citotoxicidad dependiente del complemento ("CDC"), la citotoxicidad dependiente de anticuerpo ("ADCC") y la producción anormal del anticuerpo, son efectos secundarios indeseados que pueden estar asociados a los anticuerpos terapéuticos.

65 Varias funciones efectoras del anticuerpo están mediadas al menos en parte por los receptores Fc (FcR), que unen la región Fc de un anticuerpo en el dominio constante de una inmunoglobulina típica. Existe un número de receptores Fc que son específicos para diferentes clases de inmunoglobulinas. Las clases de inmunoglobulinas incluyen IgG, IgE, IgA, IgM, e IgD. Las clases de inmunoglobulinas además se dividen en subclases: IgG se divide en cuatro subclases

(IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4) e IgA se divide en dos subclases (IgA1 e IgA2). Existen tres receptores conocidos para IgG: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), y FcγRIII (CD 16). Cada subclase FcγR se codifica por dos o tres genes, una división de ARN alternativa que conduce a múltiples transcripciones y a una amplia diversidad en isoformas FcγR.

5 Típicamente, las inmunoglobulinas son moléculas en forma de Y que comprenden dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. Los enlaces de bisulfuro enlazan juntos los pares de cadena pesada y ligera así como las dos cadenas pesadas. Cada cadena consiste en un dominio variable que varía en la secuencia y es responsable de la unión del antígeno; los dominios son conocidos como los dominios V_H y V_L para las cadenas pesadas y ligeras, respectivamente. En la cadena ligera existe un solo dominio constante (C_L) y en la cadena pesada existen tres dominios constantes (C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}). Las moléculas que contienen todos los dominios variable y constante pueden denominarse anticuerpos completos.

15 Los restos en los dominios de variable de anticuerpo convencionalmente se enumeran de acuerdo con el sistema diseñado por Kabat et al. Este sistema se determina en Kabat et al., 1987, in Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (en lo sucesivo "Kabat et al., *supra*"). Este sistema de enumeración se utiliza en el presente documento memoria descriptiva excepto en donde se indica lo contrario. Se deberá observar que las designaciones de resto de Kabat no siempre corresponden directamente a la enumeración lineal de los restos de aminoácido. La secuencia de aminoácido lineal actual puede contener menos o aminoácidos adicionales que en la numeración de Kabat estricta que corresponde a la abreviación de, o inserción en, un componente estructural, ya sea el marco, o la región de determinación de complementariedad (CDR), de la estructura del dominio variable básica. La enumeración de Kabat correcta de los restos puede determinarse para un anticuerpo dado mediante la alineación de los restos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada Kabat "convencional".

25 Existen tres regiones dentro de los dominios variables que son hipervariables en la secuencia establecida dentro de cuatro regiones marco más altamente conservadas. Estas CDR hipervariables son principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. Las CDR del dominio variable de cadena pesada se localizan en los restos 31-35 (CDR-H1), restos 50-65 (CDR-H2) y los restos 95-102 (CDR-H3), de acuerdo con el sistema de enumeración de Kabat. Sin embargo, de acuerdo con Chothia (Chothia, C. y Lesk, A.M. *J. Mol. Biol.*, 1987, 196:901-917), el equivalente del bucle para CDR-H1 se extiende desde el resto 26 al resto 32. De esta forma 'CDR-H1', como se utiliza en el presente documento, también incluye una CDR localizada en los restos 26 a 35, como se describe a través de una combinación del sistema de enumeración de Kabat y la definición del bucle topológico de Chothia. Las CDR del dominio variable de cadena ligera se localiza en los restos 24-34 (CDR-L1), los restos 50-56 (CDR-L2), y los restos 89-97 (CDR-L3) de acuerdo con el sistema de enumeración de Kabat.

35 Aunque los anticuerpos de origen natural, como anticuerpos completos o como fragmentos que retienen las propiedades de unión específica, originalmente derivaron de especies individuales, los anticuerpos genéticamente modificados pueden derivar de más de una especie de animal, por ejemplo, anticuerpos quiméricos. Hasta la fecha, se han generado principalmente los anticuerpos quiméricos de ratón (murino)/humano y de murino/primate no humano, aunque también son posibles otras combinaciones de especies híbridas. Se conocen muchas configuraciones diferentes de polipéptidos de anticuerpos de origen natural y modificados genéticamente, y derivados y fragmentos de los mismos. La característica común para todos es que el polipéptido o polipéptidos retienen la especificidad de unión a antígeno a través de uno o más dominios de unión a epítipo. Aparte de la unión al epítipo, las propiedades funcionales de un polipéptido de anticuerpo pueden diferir dependiendo de qué otras secuencias están presentes, por ejemplo, dominios FC u otras secuencias que activan las funciones efectoras y/o interactúan con otras rutas celulares.

50 Las proteínas de unión a CD154 que comprenden los dominios de unión del epítipo (tales como CDR o dominios variables) incorporadas en un andamio o marco distinto de inmunoglobulina (véase, por ejemplo, et al, 2005 Nat Biotech 23: 1257-1268; Hosse *et al.*, 2006 Protein Science 15: 14-27) pueden exhibir funciones efectoras reductoras. Los anticuerpos anti-CD154 se desvelan en los documentos WO 01/68860 y WO2005/011376. Sería deseable tener nuevas proteínas de unión que específicamente antagonizan la unión de CD154 a CD40 y reducen o eliminan las funciones aguas abajo del complejo CD154-CD40. También sería deseable tener proteínas de unión a CD154 tales como los anticuerpos anti-CD154, con funciones efectoras reducidas en comparaciones con los anticuerpos anti-CD154 conocidos.

55 Sumario de la invención

60 La presente divulgación proporciona una solución a estos y otros problemas proporcionando una proteína de unión, tales como un anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo, aislado, recombinante o sintético, que se une específicamente a una proteína CD154, que puede ser una proteína CD154 humana. Los anticuerpos anti-CD154 de la divulgación, que incluyen fragmentos y derivados de los mismos, pueden ser anticuerpos monoclonales, policlonales murinos, quiméricos, primatizados, humanizados o completamente humanos. Los anticuerpos anti-CD154 de la divulgación pueden ser multiméricos, heterodiméricos, hemidiméricos, monovalentes, bivalentes, tetravalentes, biespecíficos y pueden incluir anticuerpos de cadena individual; y derivados de los mismos.

65

La presente invención se dirige a los siguientes artículos:

[1] Un anticuerpo anti-CD 154 o un fragmento de unión a CD 154 del mismo, que comprende:

- 5 (a) una secuencia del dominio V_H de acuerdo con SEQ ID NO: 1 de la Figura 5; y
 (b) una secuencia de dominio V_L de acuerdo con SEQ ID NO: 2 de la Figura 6.

[2] El anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con el artículo [1], que comprende:

- 10 (a) una secuencia de cadena pesada seleccionada de SEQ ID NO: 12 de la Figura 7, SEQ ID NO: 13 de la Figura 7 y SEQ ID NO: 72 de la Figura 16; y
 (b) una secuencia de cadena ligera seleccionada de SEQ ID NO: 15 de la Figura 7 y SEQ ID NO: 69 de la Figura 15.

[3] El anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con el artículo [2], que comprende secuencias de cadena pesada y ligera seleccionadas de:

- 15 (a) SEQ ID NO: 12 de la Figura 7 y SEQ ID NO: 15 de la Figura 7, respectivamente;
 20 (b) SEQ ID NO: 13 de la Figura 7 y SEQ ID NO: 15 de la Figura 7, respectivamente; y
 (c) SEQ ID NO: 72 de la Figura 16 y SEQ ID NO: 69 de la Figura 15, respectivamente.

[4] El anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con el artículo [3], que comprende secuencias de cadena pesada y ligera de SEQ ID NO: 13 de la Figura 7 y SEQ ID NO: 15 de la Figura 7, respectivamente.

[5] El anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con los artículos [1]-[4], en donde:

- 30 (a) el anticuerpo anti-CD 154 es un anticuerpo anti-CD154 seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo multimérico, un anticuerpo heterodimérico, un anticuerpo hemidimérico, un anticuerpo tetravalente, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo de cadena única y derivados de los mismos; o
 (b) el anticuerpo anti-CD 154 es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-CD 154 y dicho fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en Fab, F(ab)₂, Fab', F(ab')₂, F(ab')₃, Fd y Fv;

[6] El anticuerpo de unión anti-CD 154 de acuerdo con el artículo [5], en donde dicho anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo se modifican por una unión covalente de poli(etilenglicol) o un derivado del mismo.

[7] El anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con el artículo [6], en donde el anticuerpo CD 154 es un fragmento Fab' en donde un grupo tiol en una región bisagra modificada se une covalentemente a un grupo maleimida que está unido covalentemente a un resto lisina, en donde un polímero de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20 000 Da se fija a cada uno de los grupos amina de la lisina.

[8] El anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con el artículo [1], en donde:

- 50 (a) el anticuerpo o el fragmento del mismo carece de una región Fc de inmunoglobulina; o
 (b) el anticuerpo o el fragmento del mismo comprende una región Fc de inmunoglobulina seleccionada de una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, o deriva de una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

[9] El anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con el artículo [1], en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo comprende además una región Fc variante que es una región Fc híbrida que comprende secuencias de más de un tipo de dominio Fc de Ig.

[10] El anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los artículos [1]-[9], en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo no están glicosilados.

[11] El anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los artículos [1]-[10], en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo se enlaza a un resto funcional seleccionado de un resto de bloqueo, un resto detectable, un resto terapéutico o una combinación de los mismos.

[12] El anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los artículos [1]-[11], en donde el fragmento es una fusión de Fab, Fab', Fd, Fv, un scFv, un scFab o un scFab sin cisteína.

[13] Una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los artículos [1]-[12].

[14] La molécula de ácido nucleico del artículo [13], en donde la molécula de ácido nucleico es una molécula de ADN que codifica un anticuerpo anti-CD 154 o un fragmento de unión a CD 154 del mismo, comprendiendo la molécula de ADN una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 17 de la Figura 6, SEQ ID NO: 18 de la Figura 6, SEQ ID NO: 22 de la Figura 5, SEQ ID NO: 23 de la Figura 7, SEQ ID NO: 24 de la Figura 7, SEQ ID NO: 25 de la Figura 6, SEQ ID NO: 26 de la Figura 7, SEQ ID NO: 27 de la Figura 7, SEQ ID NO: 28 de la Figura 8, SEQ ID NO: 41 de la Figura 8, SEQ ID NO: 70 de la Figura 15 y SEQ ID NO: 73 de la Figura 16.

[15] Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el artículo 13 o una molécula de ADN de acuerdo con el artículo [14].

[16] Una célula hospedadora que comprende el vector del artículo [15].

[17] Un método para producir un anticuerpo anti-CD 154 o un fragmento de unión a CD 154 del mismo, en donde dicho método comprende las etapas de:

- (a) cultivar una célula hospedadora de acuerdo con el artículo [16] en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo, por dicha célula hospedadora; y
- (b) recuperar el anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo.

[18] El método de acuerdo con el artículo [17], en donde la célula hospedadora es una célula procariota o una eucariota.

[19] Una composición que comprende el anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los artículos [1]-[12] y un vehículo farmacéutico adecuado.

[20] La composición de acuerdo con el artículo [19], en donde dicha composición comprende además un compuesto o agente inmunosupresor o inmunomodulador adicional.

[21] Uso del anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los artículos [1]-[12] o de la composición de acuerdo con el artículo [19] o [20] en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir una afección, un trastorno o una enfermedad humanos mediados en total o en parte por la señalización de CD40 o un síntoma de cualquiera de los anteriores, en donde dicha afección, trastorno o enfermedad es preferentemente una respuesta inflamatoria o autoinmune o fibrosis.

[22] El uso de acuerdo con el artículo [21], en donde la respuesta inflamatoria o autoinmune o fibrosis se selecciona de artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, espondilartrosis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, psoriasis, escleroderma, nefritis por lupus, púrpura trombocitopénico idiopático, enfermedad vascular y esclerosis múltiple.

[23] El anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los artículos [1]-[12] o la composición de acuerdo con el artículo [19] o [20] para su uso en el tratamiento o la prevención de una afección, un trastorno o una enfermedad humanos mediados en total o en parte por la señalización de CD40 o un síntoma de cualquiera de los anteriores, en donde dicha afección, trastorno o enfermedad es preferentemente una respuesta inflamatoria o autoinmune o fibrosis.

[24] El anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los artículos [1]-[12] o la composición de acuerdo con el artículo [19] o [20] para su uso en el tratamiento o la prevención de una respuesta inflamatoria o autoinmune o fibrosis de acuerdo con el artículo [23], en donde la respuesta inflamatoria o autoinmune o fibrosis se selecciona de artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, espondilartrosis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, psoriasis, escleroderma, nefritis por lupus, púrpura trombocitopénico idiopático, enfermedad vascular y esclerosis múltiple.

En ciertas realizaciones, las proteínas de unión a CD154, por ejemplo, los anticuerpos anti-CD154, de la presente divulgación tienen alta selectividad por CD154, y en algunas realizaciones, también tienen una o más funciones efectoras reducidas en comparación, por ejemplo, con el anticuerpo 5c8 anti-CD154 (producido por el hibridoma depositado bajo el N.º de Acceso HB 10916 ATCC, como se describe en el documento US 5.474.771, o 5c8 humanizado). Algunas de las proteínas de unión a CD154, por ejemplo, anticuerpos anti-CD154, de la divulgación son monovalentes para la unión de CD154.

Las proteínas de unión a CD154 y los anticuerpos anti-CD154 (incluyendo fragmentos y derivados de anticuerpos) de la divulgación son útiles para inhibir la unión de CD154 a CD40 y hacer esto con una alta especificidad, por ejemplo, con un IC50 en el intervalo de 20 pM a 1,5 μM, inclusive. En ciertas realizaciones, las proteínas de unión a CD154, por ejemplo, anticuerpos anti-CD154 de la divulgación pueden tener un IC50 en el intervalo de 20 ppm a 500 ppm, de

50 pm a 500 pm o de 100 pm a 500 pm. En ciertas realizaciones, las proteínas de unión a CD154 y los anticuerpos anti-CD154 (incluyendo fragmentos y derivados de anticuerpos) de la divulgación no agonizan sustancialmente la actividad de CD40.

5 Ciertas realizaciones de la presente divulgación se refieren a proteínas de unión a CD154, por ejemplo, anticuerpos anti-CD154, que exhiben una alta afinidad por CD154 humano. Por ejemplo en ciertas realizaciones, una proteína de unión a CD154, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD154, se disocia del CD154 humano (CD40L humano) con una K_D en el intervalo de 50 nM a 1 pM, inclusive, según se determina por resonancia de plasmón de superficie (por ejemplo, Biacore®). Por ejemplo, la K_D para CD154 humano puede ser 50 pm a 1 pm, 20 pm a 1 pm o aún 10 pm a 1 pm. En algunas realizaciones, la K_D para CD154 humano es menor de 20 pM. En otras realizaciones, la K_D para CD154 humano es menor de 10 pM.

15 En ciertas realizaciones, esta divulgación proporciona una proteína de unión a CD154, por ejemplo un anticuerpo anti-CD154, que cuando está presente en o por encima de las concentraciones de saturación para la unión de CD154 con base en su afinidad de unión, es capaz de bloquear la unión del anticuerpo 5c8 para CD154 cuando se añade primero a CD154, y también es capaz de desplazar el anticuerpo 5c8 unido a CD154 cuando se añade después de que se añada el anticuerpo 5c8 a CD154.

20 En ciertas realizaciones, esta divulgación proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que se une específicamente a una proteína CD154 y que comprende o consiste en una o más secuencia o secuencias de cadena pesada de CDR (H) seleccionadas de CDR-H1 (SEQ ID NO: 3), CDR-H2 (SEQ ID NO: 4) y CDR-H3 (SEQ ID NO: 5). En realizaciones adicionales, la proteína de unión a CD154 o anticuerpo comprende o consiste en al menos dos CDR seleccionados de CDR-H1 (SEQ ID NO: 3), CDR-H2 (SEQ ID NO: 4) y CDR-H3 (SEQ ID NO: 5). En aún realizaciones adicionales, la proteína de unión o anticuerpo comprende o consiste en las tres secuencias H CDR, que están en CDR-H1 (SEQ ID NO: 3), el CDR-H2 (SEQ ID NO: 4) y el CDR-H3 (SEQ ID NO: 5).

25 En ciertas realizaciones, esta divulgación proporciona una proteína de unión, por ejemplo, anticuerpo, que específicamente une una proteína CD154 y que comprende o consiste en una o más secuencia o secuencias de cadena ligera CDR (L) seleccionada de CDR-L1 (SEQ ID NO: 6), CDR-L2 (SEQ ID NO: 7) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 8). En realizaciones adicionales, la proteína o anticuerpo de unión a CD154 comprende o consiste en al menos dos CDR seleccionadas de CDR-L1 (SEQ ID NO: 6), CDR-L2 (SEQ ID NO: 7) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 8). En aún otra realización, la proteína o anticuerpo CD154 comprende o consiste en las tres secuencias L CDR, que son CDR-L1 (SEQ ID NO: 6), CDR-L2 (SEQ ID NO: 7) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 8).

35 En ciertas realizaciones, esta divulgación proporciona una proteína de unión, por ejemplo, anticuerpo, que específicamente une a una proteína CD154 y que comprende o consiste en CDR-L1 (SEQ ID NO: 6), CDR-L2 (SEQ ID NO: 7) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 8), y en donde la proteína o anticuerpo además comprende o consiste en CDR-H1 (SEQ ID NO: 3), CDR-H2 (SEQ ID NO: 4) y CDR-H3 (SEQ ID NO: 5).

40 En ciertas realizaciones, esta divulgación proporciona una proteína de unión, por ejemplo, anticuerpo que específicamente une a una proteína CD154, en donde la proteína de unión a CD154 o anticuerpo comprende o consiste en una secuencia V_H seleccionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11. En ciertas otras realizaciones, está divulgación proporciona una proteína de unión, por ejemplo, anticuerpo, que específicamente une a una proteína CD154, en donde la proteína de unión a CD154 o anticuerpo comprende o consiste en una secuencia de cadena pesada seleccionada de SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13.

45 En ciertas realizaciones, esta divulgación proporciona una proteína de unión, por ejemplo, anticuerpo, que específicamente une una proteína CD154, en donde la proteína o anticuerpo de unión a CD154 comprende o consiste en la secuencia V_L seleccionada de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 14. En ciertas realizaciones, esta divulgación proporciona una proteína de unión, por ejemplo, anticuerpo, que específicamente une a una proteína CD154, en donde la proteína de unión a CD154 o anticuerpo comprende o consiste en una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 15.

50 En ciertas realizaciones, esta divulgación proporciona una proteína de unión, por ejemplo, anticuerpo, que específicamente une una proteína, CD154, en donde la proteína de unión a CD154 o anticuerpo comprende o consiste en una secuencia V_L seleccionada de SEQ ID NO: 2, y SEQ ID NO: 14 y una secuencia V_H seleccionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11. En ciertas realizaciones, esta divulgación proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que específicamente une una proteína CD154, en donde la proteína de unión a CD154 o anticuerpo comprende o consiste en una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 15, y una secuencia de cadena pesada seleccionada de SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13. En otras realizaciones, la proteína de unión a CD154 o anticuerpo comprende o consiste en una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO: 13.

55 En otras realizaciones, la presente divulgación se refiere a un proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que específicamente une CD154, y comprende o consiste en una o más secuencia o secuencias, CDR de cadena pesada (H) seleccionada de CDR-H1 (SEQ ID NO: 42), CDR-H2 (SEQ ID NO: 43) y CDR-H3 (SEQ ID NO: 44). En realizaciones

adicionales, la proteína de unión o el anticuerpo comprenden o consiste en al menos dos CDR seleccionados de CDR-H1 (SEQ ID NO: 42), CDR-H2 (SEQ ID NO: 43) y CDR-H3 (SEQ ID NO: 44). En aún otras realizaciones, la proteína de unión o anticuerpo comprende o consiste en las tres secuencias H CDR, que son CDR-H1 (SEQ ID NO: 42), CDR-H2 (SEQ ID NO: 43) y la CDR-H3 (SEQ ID NO: 44).

5 En ciertas realizaciones, esta divulgación proporciona una proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que específicamente une una proteína CD154, en donde la proteína de unión o anticuerpo comprende o consiste en una o más secuencias de cadena ligera (L) CDR seleccionadas de CDR-L1 (SEQ ID NO: 45), CDR-L2 (SEQ ID NO: 46) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 47). En realizaciones adicionales, la proteína de unión o anticuerpo comprende o consiste en al menos dos CDR seleccionados de CDR-L1 (SEQ ID NO: 45), CDR-L2 (SEQ ID NO: 46) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 47). En aún otras realizaciones, la proteína de unión o anticuerpo comprende o consiste en las tres secuencias L CDR, que son CDR-L1 (SEQ ID NO: 45), CDR-L2 (SEQ ID NO: 46) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 47).

15 En ciertas realizaciones, una proteína de unión a CD154, o anticuerpo anti-CD154 de la presente divulgación comprende una secuencia complementaria que comprende o consiste en una o más CDR de cadena ligera de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, por arriba, o una secuencia complementaria que comprende o consiste en uno o más CDR de cadena pesada de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, anterior, respectivamente. De esta forma, en ciertas realizaciones, una proteína de unión o anticuerpo de esta invención comprende o consiste en CDR-H1 (SEQ ID NO: 42), CDR-H2 (SEQ ID NO: 43) o CDR-H3 (SEQ ID NO: 44), y CDR-L1 (SEQ ID NO: 45), CDR-L2 (SEQ ID NO: 46) o CDR-L3 (SEQ ID NO: 47).

25 En ciertas realizaciones, esta divulgación proporciona una proteína de unión a CD154, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD154, en donde la proteína de unión o anticuerpo comprende o consiste en las tres siguientes secuencias L CDR: CDR-L1 (SEQ ID NO: 45), CDR-L2 (SEQ ID NO: 46) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 47), y en donde la proteína de unión o anticuerpo además comprende o consiste en las tres siguientes secuencias H CDR: CDR-H1 (SEQ ID NO: 42), CDR-H2 (SEQ ID NO: 43) y CDR-H3 (SEQ ID NO: 44).

30 En realizaciones adicionales, esta divulgación proporciona una proteína de unión, por ejemplo, anticuerpo, que específicamente une CD154, y que comprende o consiste en una secuencia de cadena ligera variable (V_L) de SEQ ID NO: 54. Esta divulgación también se refiere a una proteína de unión CD 154 o anticuerpo anti-CD154 que comprende o consiste en una secuencia de cadena pesada variable (V_H) de SEQ ID NO: 56. En ciertas realizaciones, una proteína de unión a CD154 o anticuerpo anti-CD154 de la divulgación puede comprender o consistir de ambas una secuencia V_L SEQ ID NO: 54 y una secuencia V_H de SEQ ID NO: 56.

35 En otras realizaciones, la presente divulgación se refiere a una proteína de unión a CD154, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD154, que específicamente une CD154, en donde la proteína de unión a CD154 o el anticuerpo anti-CD154 comprende o consiste en una o más secuencia o secuencias CDR de cadena pesada (H) seleccionada de CDR-H1 (SEQ ID NO: 48), CDR-H2 (SEQ ID NO: 49) y CDR-H3 (SEQ ID NO: 50). En realizaciones adicionales, la proteína de unión a CD154 o anticuerpo anti-CD154 comprende o consiste en al menos dos CDR seleccionadas de CDR-H1 (SEQ ID NO: 48), CDR-H2 (SEQ ID NO: 49) y CDR-H3 (SEQ ID NO: 50). En realizaciones adicionales, la proteína de unión a CD154 o el anticuerpo anti-CD154 comprende o consiste en las tres secuencias H CDR, que son CDR-H1 (SEQ ID NO: 48), CDR-H2 (SEQ ID NO: 49) y CDR-H3 (SEQ ID NO: 50).

45 En ciertas realizaciones, esta divulgación proporciona una proteína de unión a CD154, por ejemplo, un anticuerpo anti-CE154, que específicamente une a una proteína CD154, en donde la proteína CD154 o el anticuerpo anti-CD154 comprende o consiste en una o más secuencias de cadena ligera (L) CDR seleccionadas de CDR-L1 (SEQ ID NO: 51), CDR-L2 (SEQ ID NO: 52) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 53). En realizaciones adicionales, la proteína de unión a CD154 o el anticuerpo anti-CD154 comprende o consiste en al menos dos CDR seleccionadas de CDR-L1 (SEQ ID NO: 51), CDR-L2 (SEQ ID NO: 52) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 53). En realizaciones, la proteína de unión a CD154 o el anticuerpo anti-CD154 comprende o consiste en las tres secuencias L CDR, que son CDR-L1 (SEQ ID NO: 51), CDR-L2 (SEQ ID NO: 52) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 53).

55 En ciertas realizaciones, una proteína de unión a CD154, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD154, de la presente divulgación comprende una secuencia complementaria que comprende o consiste en una o más CDR de cadena ligera de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, anterior, o una secuencia complementaria que comprende o consiste en una o más CDR de cadena pesada, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, anterior, respectivamente. De esta forma, en ciertas realizaciones, un anticuerpo de la divulgación comprende o consiste en una CDR H seleccionada de (SEQ ID NO: 48), CDR-H2 (SEQ ID NO: 49) y CDR-H3 (SEQ ID NO: 50), o una CDR L seleccionada de CDR-L1 (SEQ ID NO: 51), CDR-L2 (SEQ ID NO: 52) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 53).

60 En ciertas realizaciones, esta divulgación proporciona una proteína de unión a CD154, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD154, en donde la proteína de unión a CD154 o el anticuerpo anti-CD154 comprende o consiste en las tres secuencias L CDR que son CDR-L1 (SEQ ID NO: 51), CDR-L2 (SEQ ID NO: 52) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 53), y en donde la proteína unión, por ejemplo, anticuerpo, además comprende o consiste en las tres secuencias H CDR que son (SEQ ID NO: 48), CDR-H2 (SEQ ID NO: 49) y CDR-H3 (SEQ ID NO: 50).

5 En realizaciones adicionales, la divulgación proporciona una proteína de unión a CD154, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD154 que específicamente une CD154, en donde la proteína de unión a CD154 o el anticuerpo anti-CD154 comprende o consiste en una secuencia V_L de SEQ ID NO: 58. En realizaciones adicionales, el anticuerpo comprende o consiste en una secuencia V_H de SEQ ID NO: 60. En realizaciones adicionales, el anticuerpo comprende o consiste en una secuencia V_H de SEQ ID NO: 60 y una secuencia de V_L de SEQ ID NO: 58.

10 En ciertas realizaciones, la proteína de unión a CD154 de esta divulgación comprende una secuencia de cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 62 y una secuencia de cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 65. En otras realizaciones, la proteína de unión a CD154 de esta divulgación comprende una secuencia de cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 63 y una secuencia de cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 66.

15 En ciertas realizaciones, la proteína de unión a CD154 de esta divulgación comprende una secuencia de cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 68, y una secuencia de cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 71. En otras realizaciones, la proteína de unión a CD154 de esta divulgación comprende una secuencia de cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 69 y una secuencia de cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 72. En otras realizaciones, la proteína de unión a CD154 comprende al menos una de las secuencias de acuerdo con SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72.

20 Las secuencias CDR de SEQ ID NO: 3-8 derivan del anticuerpo monoclonal de rata 342. En una realización alternativa de la divulgación, el anticuerpo anti-CD154 es el anticuerpo 342 de rata que comprende la secuencia del dominio V_H de SEQ ID NO: 29 y la secuencia del dominio V_L de SEQ ID NO: 30. Esta invención también proporciona una molécula de ADN aislado, recombinante o sintético que comprende o consiste en al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32. Adicionalmente se proporciona un vector que comprende al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34.

25 La divulgación también proporciona proteínas de unión a CD154, por ejemplo, anticuerpos anti-CD154, que se unen selectivamente al mismo epítipo como lo hace cualquiera de los anticuerpos anti-CD154 descritos en el presente documento (por ejemplo, los anticuerpos 342, 381 y 338 y la secuencia de epítipo de estos). En particular, los anticuerpos 342 y 338 de la presente invención exhiben similares propiedades de unión a CD154 cuando se utilizan como primero o segundo anticuerpos en ensayos de competencia con el anticuerpo 5c8 anti-CD154, como se describe en el presente documento.

30 De esta forma, en ciertas realizaciones, la divulgación proporciona proteínas de unión a CD154 y anticuerpos anti-CD154 que se unen al mismo epítipo como lo hace un anticuerpo humanizado que comprende una secuencia de cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13 y comprende una secuencia de cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 15 (342 Fab y fragmentos Fab'), y que exhiben propiedades de unión a CD154 similares cuando se utilizan como primero o segundo anticuerpos en ensayos de competencia con el anticuerpo anti-CD154 5c8, como se describe en el presente documento. En otras realizaciones, la divulgación proporciona proteínas de unión a CD154 y anticuerpos anti-CD154 que se unen al mismo epítipo como lo hace un anticuerpo humanizado que comprende la secuencia del dominio V_L de acuerdo con SEQ ID NO: 58 y la secuencia del dominio V_H de acuerdo con SEQ ID NO: 60 (secuencias variables de anticuerpo 338), y que exhiben propiedades de unión a CD154 similares en ensayos de competencia con el anticuerpo anti-CD154 5c8, como se describe en el presente documento.

35 En cualquiera de las realizaciones anteriores relacionadas con una proteína de unión a CD154 de la divulgación, la proteína de unión puede estar PEGilada. En realizaciones en donde la proteína de unión a CD154 es un anticuerpo anti-CD154, polipéptido del anticuerpo o fragmento o derivado de éste, el anticuerpo puede estar PEGilado en la cadena pesada, la cadena ligera, o ambas cadenas.

40 La presente divulgación también proporciona una molécula de ADN aislada, recombinante y/o sintética que comprende o consiste en al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 25.

45 En ciertas realizaciones, esta divulgación también proporciona una molécula de ADN aislada, recombinante y/o sintética que comprende o consiste en al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 70 y SEQ ID NO: 73.

50 En otras realizaciones, la divulgación proporciona una molécula de ADN aislada, recombinante y/o sintética que comprende o consiste en al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 41.

55 Esta divulgación también proporciona un vector que comprende una cualquiera de las moléculas de ADN aislada, recombinante y/o sintética de esta divulgación. En una realización, el vector comprende al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 41.

60 En realizaciones adicionales, esta divulgación proporciona una molécula de ADN aislada, recombinante y/o sintética que comprende o consiste en al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 57. En algunas

realizaciones, la divulgación proporciona una molécula de ADN aislada, recombinante y/o sintética que comprende o consiste en ambas SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 57.

5 En realizaciones adicionales, la divulgación proporciona una molécula de ADN aislada, recombinante y/o sintética que comprende o consiste en al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 61. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona una molécula de ADN aislada, recombinante y/o sintética que comprende o consiste en ambas SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 61.

10 En cualquiera de las realizaciones de la divulgación relacionadas con las proteínas de unión a CD154 y anticuerpos anti-CD154 que comprenden secuencias que contribuyen a las funciones efectoras, las proteínas de unión o anticuerpos anti-CD154, pueden adicionalmente seleccionarse o modificarse genéticamente para provocar la función efectora reducida comparada con un anticuerpo anti-CD154 que tiene una región Fc, como se describe en cualquier lugar en el presente documento. Por ejemplo, las proteínas de unión a CD154 y los anticuerpos anti-CD154 que no tienen una región Fc o secuencias de región constante, o que carecen de una región Fc funcional o secuencias de región constante, pueden seleccionarse para su uso en la divulgación.

15 En ciertas realizaciones, las proteínas de unión a CD154 y los anticuerpos anti-CD154 de la divulgación son monovalentes para la unión a CD154 y preferentemente producen funciones efectoras reducidas cuando se administran a un sujeto con relación a una proteína de unión a CD154 comparable tal como un anticuerpo anti-CD154 bivalente.

20 En ciertas realizaciones, las secuencias de la región Fc o constante, si están presentes en una proteína de unión a CD154, por ejemplo un polipéptido de anticuerpo anti-CD154, pueden seleccionarse o modificarse genéticamente para comprender una o más modificaciones (por ejemplo, sustituciones, inserciones, aductos o eliminaciones de aminoácidos) que reducen o eliminan una o más funciones efectoras con relación a un anticuerpo anti-CD154 control, que comprende secuencias de región Fc o constantes nativas, parentales o no modificadas.

25 El algunas realizaciones de la divulgación, una región FC, cuando está presente, es una región Fc de o derivada de un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunas realizaciones, las regiones Fc híbridas pueden utilizarse, es decir secuencias Fc IgG1/IgG4 híbridas. En realizaciones particulares, la región Fc comprende secuencias Fc IgG4 o se derivan del anticuerpo IgG4. Se entiende que cualquier combinación híbrida entre las diferentes regiones Fc que reduce una o más de las funciones efectoras puede utilizarse de acuerdo con la divulgación.

30 En ciertas otras realizaciones, la glicosilación de la porción Fc de un anticuerpo se reduce o elimina, o el perfil de glicosilación del anticuerpo se altera, como se describe adicionalmente en el presente documento. En ciertas realizaciones, la proteína de unión a CD154 o polipéptido de anticuerpo anti-CD154 comprende un dominio C_{H2} con una región Fc que tiene una modificación en o cerca del sitio de glicosilación enlazado a N conservado. La modificación en el sitio de glicosilación enlazado a N conservado puede comprender una mutación en o cerca del sitio de glicosilación de cadena pesada, en donde la mutación reduce, altera o evita la glicosilación en el sitio. En realizaciones, adicionales, la modificación comprende la mutación N298Q (N297 utilizando la enumeración de Kabat de EU). En ciertas realizaciones, la modificación comprende la retirada de glicanos del dominio C_{H2} o sus porciones. En ciertas realizaciones alternativas, la modificación evita la formación de un N-glicano maduro en el sitio de glicosilación.

35 En algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere a una proteína de unión a CD154, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD154 que comprende una secuencia CDR3 de cadena pesada seleccionada de SEQ ID NO: 5, 44 y 50, y una región Fc variante, la región Fc variante comprende un primer resto de aminoácido y un sitio de N-glicosilación, el primer resto de aminoácido modificado con química de cadena lateral o a través de una sustitución de aminoácido para lograr el volumen esférico aumentado o carga electrostática aumentado en comparación con el resto de aminoácido no modificado, por lo tanto reduciendo el nivel de o por el contrario alterando la glicosilación en el sitio de N-glicosilación. En ciertas de estas realizaciones, la región Fc variante confiere una función efectora reducida comparada con un control, una región Fc no variante.

40 En ciertas realizaciones, la divulgación se refiere a una proteína de unión a CD154, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD154, que comprende una secuencia CDR3 de cadena pesada seleccionada de SEQ ID NO: 5, 44 y 50, y una región Fc variante, la región Fc variante comprende un primer resto de aminoácido y un sitio de N-glicosilación, el primer resto de aminoácido comprende una tiol cisteína, por lo tanto reduciendo el nivel de o alterando la glicosilación en el sitio de N-glicosilación, en donde la región Fc variante confiere función efectora reducida.

45 En ciertas realizaciones, el primer resto de aminoácido y el sitio de N-glicosilación de los anticuerpos anti-CD154 comprende regiones Fc variantes descritas anteriormente que están cerca o dentro de un motivo de glicosilación enlazado a N. En realizaciones adicionales, el motivo de glicosilación enlazado a N comprende las secuencias de aminoácido NXT o NXS. En ciertas realizaciones, el motivo de la glicosilación enlazada a N comprende la secuencia de aminoácido NXT. En ciertas realizaciones, el sitio de N-glicosilación está localizado en el aminoácido 297 de acuerdo con el sistema de enumeración de Kabat. En realizaciones adicionales, el primer resto de aminoácido modificado es el aminoácido 299 de acuerdo con el sistema de enumeración de Kabat.

En ciertas de las realizaciones anteriores, la función efectora reducida exhibida por cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que contienen proteínas de unión descritas en el presente documento es una unión reducida a un receptor Fc (FcR). En ciertas realizaciones, el receptor (FcR) se selecciona de FcγRI, FcγRII y FcγRIII, y uno o más subtipos de éstos, tales como por ejemplo, FcγRIIa. En algunas realizaciones, la unión de FcR se reduce por un factor de al menos 1,5 veces o más, aproximadamente 2 veces o más, aproximadamente 3 veces o más, aproximadamente 4 veces o más, aproximadamente 5 veces o más, aproximadamente 6 veces o más, aproximadamente 7 veces o más, aproximadamente 8 veces o más, aproximadamente 9 veces o más, aproximadamente 10 veces o más, aproximadamente 15 veces o más, aproximadamente 50 veces o más, o aproximadamente 100 veces o más.

En ciertas realizaciones, una proteína de unión a CD154, por ejemplo un anticuerpo anti-CD154, de la divulgación con una o más funciones efectoras reducidas como se describe en el presente documento no se une a un receptor efector específico o subtipo receptor efector. En ciertas de estas realizaciones, la proteína de unión a CD154, por ejemplo un anticuerpo anti-CD154, no se une a FcγRIIa.

En ciertas realizaciones, la función efectora reducida exhibida por cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento es una unión reducida a una proteína complementaria. En algunas realizaciones, la proteína complementaria es C1q. En ciertas realizaciones, la unión reducida a una proteína complementaria es por un factor de aproximadamente 1,5 veces o más, aproximadamente 2 veces o más, aproximadamente 3 veces o más, aproximadamente 4 veces o más, aproximadamente 5 veces o más, aproximadamente 6 veces o más, aproximadamente 7 veces o más, aproximadamente 8 veces o más, aproximadamente 9 veces o más, aproximadamente 10 veces o más, o aproximadamente 15 veces o más.

En realizaciones adicionales de la presente divulgación, una proteína de unión a CD154, por ejemplo un anticuerpo anti-CD154, de la divulgación comprende una o más modificaciones o variaciones en la región Fc, no está glicosilada y provoca una o más funciones efectoras reducidas cuando se administra a un sujeto.

En ciertas realizaciones, una proteína de unión a CD154, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD154 de la divulgación causa menos efectos tromboembólicos que la administración del anticuerpo 5c8 anti-CD154 cuando se administra a un sujeto.

En ciertas realizaciones de la presente divulgación, el primer resto modificado de las proteínas de unión a CD154 o anticuerpos anti-CD154 que comprenden las regiones Fc variantes descritas anteriormente se enlaza a una fracción funcional. En realizaciones adicionales, la fracción funcional es una fracción de bloqueo, una fracción detectable, una fracción de diagnóstico o una fracción terapéutica, o una combinación de éstas. Una fracción de bloqueo, en ciertas realizaciones, puede ser, por ejemplo, un aducto de cisteína, un disulfuro mixto, un polietilenglicol o una maleimida de polietilenglicol. Una fracción detectable, en ciertas realizaciones, puede ser, por ejemplo, una fracción fluorescente, una fracción luminiscente o una fracción isotópica. En realizaciones en donde se utiliza una fracción de diagnóstico, la fracción de diagnóstico puede ser capaz de revelar la presencia de una afección, enfermedad o trastorno. En otras realizaciones puede utilizarse la fracción terapéutica tal como por ejemplo, un agente anti-inflamatorio, un agente anti-cancerígeno, un agente anti-neurodegenerativo, un anticuerpo que es selectivo para una molécula diferente de CD154, o un agente anti-infeccioso.

En ciertas realizaciones de la presente divulgación, una proteína de unión a CD154, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD154 comprende un resto de aminoácido modificado, la modificación permite la conjugación dirigida al sitio de la proteína o anticuerpo para una fracción funcional, tal como para una pegilación dirigida al sitio. En ciertas realizaciones, el resto de aminoácido modificado es un resto de cisteína modificado por una cisteína o un aducto de disulfuro mixto. De esta forma, en ciertas realizaciones, la proteína de unión a CD154 es un polipéptido de anticuerpo anti-CD154 que está pegilado en un resto de aminoácido modificado, por ejemplo, en un resto de cisteína o lisina. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD154 es un fragmento Fab o Fab' pegilado con una PEG-maleimida.

Esta divulgación también proporciona ácido nucleico, por ejemplo, secuencias de ADN que codifican las proteínas de unión a CD154, por ejemplo, anticuerpos anti-CD154, de la divulgación. Las secuencias de ADN de la presente divulgación pueden comprender ADN sintético, por ejemplo, producido a través del procesamiento químico, ADNc, ADN genómico o cualquier combinación de éstos. Esta divulgación además proporciona vectores de clonación o expresión que comprende uno o más ácidos nucleicos, por ejemplo secuencias de ADN de la presente divulgación. La divulgación también se refiere, en algunas realizaciones, a un vector que comprende cualquiera de los ácidos nucleicos sintético, aislado y/o recombinante descritos anteriormente.

Esta divulgación también proporciona una célula hospedadora que comprende una secuencia de ADN o un vector de la divulgación. En ciertos aspectos, la presente divulgación se refiere a un método para producir una proteína de unión a CD154, por ejemplo anticuerpo anti-CD154 que comprende cultivar una célula hospedadora que comprende cualquiera de los vectores descritos anteriormente bajo condiciones adecuadas para producir la proteína de unión a CD154 o anticuerpo anti-CD154 a través de la célula hospedadora. En algunas realizaciones, el método comprende recuperar la proteína de unión a CD154 o anticuerpo anti-CD154 del cultivo de la célula hospedadora.

En ciertas realizaciones, la proteína de unión a CD154, el anticuerpo anti-CD154 o el ácido nucleico de esta divulgación se marcan con un marcador detectable, que puede ser un isótopo radioactivo, un enzima, un colorante o biotina. En otras ciertas realizaciones, el anticuerpo de esta divulgación se conjuga con al menos otro agente terapéutico, que puede ser un radioisótopo, radionúclido, toxina, toxoide, un polipéptido o fragmento de anticuerpo específico no CD154 (es decir, creando un anticuerpo diespecífico o multiespecífico), o agente quimioterapéutico, por ejemplo. En aún otras realizaciones, el anticuerpo de esta invención se conjuga con un agente formador de imágenes, que podría ser una fracción marcadora. El agente marcador también puede ser una biotina, una fracción fluorescente o luminiscente, una fracción radioactiva, una etiqueta de histidina, o una etiqueta de péptido.

La presente divulgación también se refiere a variantes de secuencia de las proteínas de unión a CD154, por ejemplo, anticuerpos anti-CD154, descritos en el presente documento, y secuencias de ácido nucleico que las codifican. Las variantes de secuencia de la invención preferentemente comparten al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 % o 94 % de identidad con un polipéptido de la divulgación o con una secuencia de ácido nucleico que la codifica. Más preferentemente, una variante de secuencia comparte al menos 95 %, 96 %, 97 % o 98 % de identidad con el aminoácido o nivel de ácido nucleico. Más preferentemente, las variantes de secuencias comparten al menos 99 %, 99,5 %, 99,9 % o más de identidad con un polipéptido de la invención o una secuencia de ácido nucleico que la codifica.

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona una proteína aislada que comprende una secuencia que es al menos 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9 o 100 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71 o SEQ ID NO: 72.

En ciertas realizaciones, un polipéptido del anticuerpo anti-CD154, quimérico, humanizado o humano, de la divulgación es, por ejemplo, un dAb, Fab, Fab', scFv, Fv, un Fv enlazado a disulfuro o comprende un solo dominio variable de inmunoglobulina, tal como un dominio V_H o a V_L, que es específico y monovalente para la unión de CD154. Ciertas proteínas de unión a CD154, por ejemplo, polipéptidos del anticuerpo anti-CD154 quimérico, humanizado o humano de la divulgación comprenden 1, 2 o más CDR de la invención y el andamio alternativo o secuencias marco universales. En ciertas realizaciones, las proteínas de unión a CD154 y los anticuerpos anti-CD154 de la divulgación comprenden un solo dominio variable seleccionado de una cadena pesada variable (V_H) y una cadena ligera variable (V_L).

La divulgación también proporciona una proteína de unión a CD154, por ejemplo, un polipéptido del anticuerpo anti-CD154 quimérico, humanizado o humano, que es monovalente para la unión a CD154 que se conjuga con una fracción funcional que aumenta su vida media *in vivo* con relación al mismo polipéptido que carece de la fracción funcional. En ciertas realizaciones, la fracción funcional comprende o consiste en polietilenglicol. En ciertas realizaciones, la fracción funcional comprende o consiste en una molécula de albúmina tal como albúmina de suero humano. Por consiguiente, la divulgación proporciona una proteína de unión a CD154 enlazada a PEG, por ejemplo, un polipéptido del anticuerpo anti-CD154 quimérico humanizado o humano enlazada a PEG que especifica y monovalentemente une CD154, y que tiene una vida media *in vivo* aumentada con relación al mismo polipéptido que carece de polietilenglicol enlazado.

Esta divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos una proteína de unión a CD154, por ejemplo un anticuerpo anti-CD154, de la presente invención, que puede, en algunas realizaciones, además comprender un portador farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la divulgación puede opcionalmente además comprender un agente bioactivo o terapéutico adicional, tal como, por ejemplo, un compuesto o agente inmunosupresor o inmunomodulador; o un agente de diagnóstico. En ciertas realizaciones, la composición comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo Fab' anti-CD154 pegilado que tiene la especificidad delepitopo del anticuerpo anti-CD154 y 342 o 338, como se describe en el presente documento.

La presente divulgación además proporciona un método para tratar o prevenir una afección, trastorno o enfermedad humana mediada en total o en parte por la señalización de CD40, o un síntoma de cualquiera de los anteriores, el método comprende la etapa de administrar al sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión a CD154, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD154, de la presente invención, de tal forma que se logra la terapia o prevención de la afección, enfermedad o trastorno.

Esta divulgación también proporciona un método para inhibir o prevenir una o más de una respuesta inmune, auto-inmune o inflamatoria mediada en total o en parte por la señalización de CD40, o un síntoma de cualquiera de los anteriores, el método comprende la etapa de administrar a un sujeto con necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende la proteína de unión a CD154, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD154, de la presente divulgación, de tal forma que se logra la respuesta terapéutica o preventiva. En ciertas realizaciones, el método se utiliza para tratar a un sujeto que presenta los signos de o diagnosticado con lupus eritematoso sistémico (SLE). En otras realizaciones, el método se utiliza para tratar a un sujeto que presenta signos de o está diagnosticado con una afección reumatoide, como por ejemplo, artritis

reumatoide.

Esta divulgación proporciona un polipéptido de anticuerpo humano que es monovalente para la unión a CD154. En ciertas realizaciones, el polipéptido de anticuerpo humano que es monovalente para la unión a CD154, cuando está presente en o por encima de las concentraciones de saturación para la unión a CD154 con base en su afinidad de unión, tanto bloquean la unión del anticuerpo 5c8 a CD154 cuando se añade al primer CD154, como desplaza la unión del anticuerpo 5c8 a CD154 cuando se añade después de que se añade el anticuerpo 5c8. En ciertas realizaciones, el polipéptido de anticuerpo humano está enlazado a PEG. En ciertas realizaciones, el polipéptido del anticuerpo humano está libre de un dominio Fc. En ciertas de las realizaciones anteriores, la proteína de unión a CD154 o el polipéptido del anticuerpo humano no desplaza la unión de CD154 a CD40.

En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona un anticuerpo Fab' anti-CD154 pegilado que es monovalente para la unión de CD154 y además proporciona métodos para tratar o prevenir uno o más de los síntomas de artritis, tal como artritis reumatoide, o lupus eritematoso sistémico (SLE) que comprende la etapa de administrar a un sujeto con necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo Fab' anti-CD154 pegilado, de tal forma que se logra una respuesta terapéutica o preventiva.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** es una tabla que proporciona las secuencias de aminoácido para las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los anticuerpos anti-CD154 342, 381 y 338.

La **Figura 2** es una tabla que proporciona las secuencias de aminoácido y de nucleótidos correspondientes para los dominios V_H y V_L del anticuerpo anti-CD154 342 de rata. Las secuencias subrayadas corresponden a las secuencias de nucleótido que codifican un péptido líder (es decir, señal).

La **Figura 3** es una tabla que proporciona las secuencias de aminoácido y de nucleótidos correspondientes de los marcos del aceptor humano utilizadas para producir los anticuerpos anti-CD154 humanizados en los Ejemplos.

La **Figura 4** es una tabla que proporciona las secuencias de aminoácido y de nucleótidos correspondientes de los dominios V_H y V_L en donde las CDR 342 se han injertado en los marcos en la Figura 3.

La **Figura 5** es una tabla que proporciona las secuencias de aminoácido y las secuencias de nucleótido correspondientes de los dominios V_H del anticuerpo 342(VH3 gH1 y VH4 gH1) en donde las CDR 342 se injertan en los marcos del aceptor humano y en donde se mantienen ciertos restos de donador clave.

La **Figura 6** es una tabla que proporciona las secuencias de aminoácido y nucleótidos correspondientes a un dominio V_L del anticuerpo 342 (VK1 gL4) en donde las CDR 342 se injertan en los marcos aceptores humanos y en donde se mantienen ciertos restos de donador clave.

La **Figura 7** es una tabla que proporciona secuencias para la cadena ligera completa (regiones de cadena ligera variable y constante) y regiones de cadena pesada del anticuerpo 342. Las secuencias que corresponden a péptidos señal/líder están subrayadas.

La **Figura 8** muestra la secuencia de nucleótido de los insertos de expresión que se utilizaron para formar las versiones Fab (SEQ ID NO: 28) y Fab' (SEQ ID NO: 41) del injerto 342 gL4gHI. Las secuencias señal/líder están subrayadas y los sitios de restricción (utilizados para la clonación en vector de expresión *E. coli* como se describe en el Ejemplo 2) están en letra mayúscula y negrita.

La **Figura 9** muestra un alineación de las cadenas ligera y pesada de la secuencia de aminoácido del anticuerpo anti-CD154 342 de rata (donador) con los marcos de la línea germinal humana (aceptor) utilizada en la humanización del anticuerpo 342. "Ligera 342" es la secuencia del dominio V_L de rata. "Pesada 342" es la secuencia del dominio V_H de rata. Los restos CDR están en negrita y subrayados. Se muestran las cadenas ligera (2 1 1 O12; SEQ ID NO: 35) y pesada (1-1 3-66; SEQ ID NO: 37 y 1-1 4-59; SEQ ID NO: 39) marco aceptoras. También se muestran los injertos solamente de CDR en los marcos aceptores de la línea germinal humana (VK1 gL3, VH3 gH7 y VH4 gH6). En ciertas cadenas ligeras y pesadas humanizadas, los restos donadores del anticuerpo 342 se retienen dentro de la región marco, y estos restos marco donadores clave se muestran en cursiva negrita y resaltados. El contenido donador VK1 gL4 es R38, Y71 y S85. El contenido donador VH3 gHI es V24, M48, G49, T73 y V78. El contenido donador VH4 gH1 es M48, R71 y V78. Las SEQ ID NO para las cadenas ligeras mostradas, en el orden de arriba hacia abajo son SEQ ID NO: 30 ("342"), SEQ ID NO: 35 ("2 1 1 O12"), SEQ ID NO: 14 ("342 gL3") y SEQ ID NO: 2 ("342 gL4"). Las SEQ ID NO para cadenas pesadas mostradas (injertos VH3) en el orden de arriba hacia abajo, son SEQ ID NO: 29 ("342"), SEQ ID NO: 37 ("1-1 3-66"), SEQ ID NO: 10 ("342 gH7"), y SEQ ID NO: 1 ("342 gHI"). Las SEQ ID NO para cadenas pesadas mostradas (injertos VH4), en orden de arriba hacia abajo son SEQ ID NO: 29 ("342"), SEQ ID NO: 39 ("1-1 4-59"), una variante de SEQ ID NO: 9 ("VH4 gH6") y variante de SEQ ID NO: 11 ("VH4 gHI"). La SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 11 variantes mostradas en la Figura 9 comienzan con el aminoácido "E" (en lugar de "Q" como en las Figura 4 y 5, respectivamente) para la expresión en *E. coli*. Por consiguiente, las secuencias de nucleótido que corresponden a estas variantes SEQ ID NO: 9 y 11 difieren en las secuencias de nucleótido establecidas en SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 21 en que estas inician con el nucleótido "g" en lugar de "c".

La **Figura 10** proporciona las secuencias de aminoácido V_L y V_H y de nucleótido correspondientes para el anticuerpo anti-CD154 381. Las secuencias de aminoácido CDR se subrayan.

La **Figura 11** proporciona las secuencias de aminoácido V_L y V_H y de nucleótidos correspondientes para el anticuerpo anti-CD154 338. Las secuencias de aminoácido CDR se subrayan.

La **Figura 12** es una tabla que enumera los anticuerpos CD154 anti-humanos de rata aislados a través del Método

del Anticuerpo del Linfocito Seleccionado (SLAM). La Tabla proporciona los valores K_d e IC_{50} obtenidos con estos anticuerpos en el ensayo de unión CD40 Biacore®, y ensayos de regulación ascendente ICAM-1. Los datos obtenidos con el anticuerpo 342 se resaltan.

La **Figura 13** proporciona las secuencias de aminoácido de cadena ligera Kappa y nucleótidos correspondientes del anticuerpo anti-CD154 aglicosilado hu5c8 (hu5c8 aglyP- hulG4).

La **Figura 14** proporciona las secuencias de aminoácido de cadena pesada y nucleótido correspondiente del anticuerpo anti-CD154 aglicosilado hu5c8 (hu5c8 aglyP- hulG4). Las mutaciones hechas para crear la variante glicosilada (S228P/T299A en la nomenclatura de EU Kabat; los restos 226 y 297) se muestran subrayados y en negrita en la secuencia de proteína madura.

La **Figura 15** proporciona las secuencias de aminoácido de cadena ligera kappa y nucleótidos correspondientes del anticuerpo anti-CD154 aglicosilado hu342 (hu342 aglyP- hulG4).

La **Figura 16** proporciona la secuencia de aminoácido de cadena pesada y nucleótido correspondientes del anticuerpo anti-CD154 aglicosilado hu342 (hu342 aglyP-hulG4). Las mutaciones hechas para hacer la variante aglicosilada (S228P/T299A en la nomenclatura de EU de Kabat; los restos 226 y 297) se muestran subrayados y en negrita en la secuencia de proteína madura.

Las **Figura 17** muestra los fragmentos Fab' ilustrativos y un gel que muestra la PEGilación específica del sitio en un fragmento Fab' de un anticuerpo anti-CD154. El Fab' se pegiló mediante la reacción de PEG-maleimida con un solo resto de cisteína en la bisagra.

La **Figura 18** es una tabla que proporciona los valores K_d e IC_{50} obtenidos en los ensayos de unión CD40 Biacore®, ensayos de regulación ascendente ICAM-1, y ensayos de unión de competencia CD40L para diferentes realizaciones del anticuerpo gL4gHI 342 humanizado incluyendo los fragmentos Fab' y los conjugados del anticuerpo-PEG.

La **Figura 19** muestra dos gráficas de los valores de la concentración IgG anti-TT (toxoides tetánico) como una función del tiempo en monos cynomolgus que reciben bien un control salino o varias dosis de anticuerpos anti-CD154. La gráfica superior muestra los valores de concentración IgG para los días 0-20 después del tratamiento con anticuerpo y el ataque con TT (la respuesta inmune primaria), y la gráfica inferior muestra los valores para los días 30-50 después del tratamiento con el anticuerpo y un segundo ataque con TT en el día 30.

La **Figura 20** es una gráfica de los valores de concentración IgG del anti-TT (toxoides tetánico) como una función del tiempo en monos cynomolgus que reciben varios formatos de anticuerpos anti-CD154 en una sola dosis (20 mg/kg para hu5x8, aglicosilo 5c8 y aglicosilo 342 y 40 mg/kg para Fab'-PEG 342 y DFM-PEG 342). DFM-PEG es un fragmento de anticuerpo en donde los dos fragmentos Fab' están entrelazados con un puente de dimaleimida PEGilado.

La **Figura 21** es una gráfica de los valores de la concentración de IgM de anti-TT (toxoides tetánico) como una función de tiempo en monos cynomolgus que reciben ya sea un control salino o varias dosis de anticuerpos anti-CE154. La grafica muestra los valores de concentración de IgM para los días 0-20 después del ataque con TT (respuesta primaria).

La **Figura 22** es una gráfica que compara los farmacocinéticos en los monos cynomolgus del anticuerpo Fab'-PEG 342 y el anticuerpo hu5c8.

La **Figura 23** muestra los resultados del análisis de citometría de flujo del bloqueo cruzado de la unión de Fab' 342 marcado a células Jurkat D1.1 que expresa CD154 pre-unidas con un primer Fab' anti-CD154 sin marcar, como se indica en cada Figura (**23A** - A33; **23B** - 338; **23C** - 402; **23D** - 381; **23E** - 300; **23F** - 294; **23G** - 335; **23H** - 303) (véase el Ejemplo 9). A33 es un anticuerpo de control en comparación con isotipo y confirma que no existe un bloqueo cruzado no específico.

La **Figura 24** muestra los resultados del análisis de citometría de flujo del bloqueo cruzado de Hu5c8 marcado de unión a células Jurkat Fab' D1.1 que expresan CD154 pre-unidas con un primer Fab' de anti-CD154 sin marcar, como se indica en cada Figura (**24A** - 338; **24B** - 402; **24C** - 381; **24D** - 303; **24E** - 335; **24F** - 300; **24G** - 294; **24H** - A33) (véase el Ejemplo 9). A33 es un anticuerpo de control en comparación con isotipo y confirma que no existe un bloqueo cruzado no específico.

Las **Figuras 25 A-F** muestran los resultados del análisis Biacore® de unión competitiva de diversas formas de los anticuerpos 342 y Hu5c8 con proteína CD154 soluble (ECD) o un complejo CD40:CD154. FL – Longitud completa. CD40hFc – proteína de fusión CD40 humana.

La **Figura 26** es una gráfica que muestra los resultados del ensayo de agregación de plaquetas descrito en el Ejemplo 11 (Ensayo 1) realizado con el anticuerpo anti-CD154 Hu5c8, el anticuerpo anti-CD154 Fab'-PEG 342 y anticuerpos de control. El primer panel muestra los resultados obtenidos con los complejos CD40L formados con IgG completa y el segundo panel muestra los complejos formados con Fab'-PEG o diFab'-PEG. El tercer panel muestra los resultados obtenidos con triFab'-PEG y el anticuerpo hu342 anti-CD154 aglicosilado.

La **Figura 27** es una gráfica que muestra los resultados de un ensayo de agregación de plaquetas descrito en el Ejemplo 1 (Ensayo 2) llevado a cabo con anticuerpos de control positivo y negativo. Los resultados demuestran que la agregación de plaquetas se mejora específicamente por los complejos del anticuerpo anti-CD154 de control positivo y CD40 L soluble humano recombinante (sCD154).

La **Figura 28** muestra un alineamiento de secuencia de secuencias de aminoácido CD40L solubles de humano y ratón. Las diferencias entre las secuencias de humano y de ratón se indican en rojo. Las secuencias del epítipo Hu5c8 se indican en azul. Los restos internos se marcan con "|". Se seleccionaron seis regiones (1-6) de la secuencia en donde se introdujeron restos humanos en el CD40L de ratón soluble.

La **Figura 29** muestra los resultados de un ensayo ELISA de competición para demostrar el bloqueo cruzado de 342 Fab' y hu5c8 Fab' (véase el Ejemplo 14). La **Figura 29A** muestra los resultados de una titulación de biotina

432 Fab' en CD154. Una concentración de 1 nM está en la parte lineal de la curva. La **Figura 29B** muestra los resultados de una titulación de biotina hu58 Fab' en CD154. Una concentración de 0.3 nM está en la parte lineal de la curva. La **Figura 29C** muestra el bloqueo cruzado de biotina 342 y biotina 5c8 a través de Fab' 342 sin marcar. ch342 Fab es el Fab' 342 quimérico. La **Figura 29D** muestra el bloqueo cruzado de biotina 342 a través de Fab' 5c8 sin marcar.

Descripción detallada de la invención

Con el fin de que la invención aquí descrita pueda entenderse más completamente, se establece la siguiente descripción detallada. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la materia a la cual pertenece esta invención. Los métodos y materiales a modo de ejemplo se describen a continuación, aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento también pueden utilizarse en la práctica de la presente invención y serán evidentes para el experto en la materia.

Los trabajos de referencia convencionales que establecen los principios generales de tecnología de ADN recombinante conocidos por los expertos en la materia incluyen Ausubel et al., *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York (1998 y Suplementos hasta 2001); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2a. Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York (1989); Kaufman et al., Eds., *Handbook Of Molecular And Cellular Methods In Biology And Medicine*, CRC Press, Boca Raton (1995); McPherson, Ed., *Directed Mutagenesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford (1991).

Los trabajos de referencia convencionales que establecen los principios generales de inmunología conocidos por los expertos en la materia incluyen: *A Laboratory Manual*, 2a. Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1999); y Roitt et al., *Immunology*, 3a. Ed., Mosby- Year Book Europe Limited, Londres (1993). Los trabajos de referencia convencionales que establecen los principios generales de fisiología médica y farmacología conocidos por los expertos en la materia incluyen: Fauci et al., Eds., *Harrison's Principles Of Internal Medicine*, 14a. Ed., McGraw-Hill Companies, Inc. (1998).

Definiciones

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "proteína de unión a CD154" incluye cualquier molécula, incluyendo un anticuerpo, que específicamente se une o antagoniza con CD154. De esta forma, como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo anti-CD154 es una clase de proteínas de unión específicas de CD154. Una proteína de unión a CD154 de la invención puede comprender al menos una, preferentemente dos, tres o más CDR, como se describe en el presente documento. Una proteína de unión a CD154 u otra tal como un antagonista de CD154 puede abarcar especies que no son fragmentos de anticuerpo clásicos o derivados pero que sin embargo comprenden secuencias de aminoácido y/o estructuras químicas que confieren especificidad de unión al epítipo CD154. Los antagonistas CD154 pueden hacerse, por ejemplo, de andamios alternativos (véase, por ejemplo, Binz et al., 2005 *Nat Biotech* 23: 1257-1268 and Hosse et al., 2006 *Protein Science* 15: 14-27). La proteína de unión a CD154 o el antagonista pueden fusionarse en una región Fc de anticuerpo que es funcionalmente deficiente o a una fracción funcional heteróloga como se describe en el presente documento para mejorar la vida media y/o otras propiedades *in vivo* de la proteína de unión a CD154.

Las proteínas de unión a CD154 pueden comprender al menos una de las CDR descritas en el presente documento incorporadas en una estructura de marco biocompatible. En un ejemplo, la estructura de marco biocompatible comprende un polipéptido o una porción suya que es suficiente para formar un soporte estructural conformacionalmente estable, un marco, un andamio, que es capaz de desplegar una o más secuencias de aminoácido que se unen a un antígeno (por ejemplo, CDR, un dominio variable, etc.) en una región de superficie localizada. Dichas estructuras pueden ser un polipéptido de origen natural o un "pliegue" polipeptídico (un motivo estructural) o puede tener una o más modificaciones, tales como adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos, con relación a un polipéptido de origen natural o pliegue. Estos andamios pueden derivarse de un polipéptido de cualquier especie (o de más de una especie) tal como humano, otro mamífero, otro vertebrado, invertebrado, planta, bacteria o virus.

Típicamente, las estructuras marco biocompatibles se basan en andamios o esqueletos de proteína diferentes de los dominios de inmunoglobulina. Por ejemplo, pueden utilizarse los basados en fibronectina, anquirina, lipocalina, neorcarzonostaina, citocromo b, dedo de zinc CP1, PST1, bobina bobinada, LACI-D1, dominio Z y dominios de tendramisat (véase, por ejemplo, Nygren y Uhlen, 1997, *Current Opinion in Structural Biology*, 7, 463-469).

El término "anticuerpo" como se utiliza en el presente documento con respecto a la invención, incluye un anticuerpo, conjugado de anticuerpo o derivado de anticuerpo aislado, recombinante o sintético. El término "anticuerpo" por lo general pretende incluir un fragmento de anticuerpo, incluyendo un fragmento de unión a antígeno, a menos que se indique lo contrario o se entienda por el contexto. Un fragmento de unión a antígeno compite con el anticuerpo intacto para la unión específica. Véase, generalmente, *Fundamental Immunology*, Cap. 7 (Paul, W., ed., 2a. ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Los fragmentos de unión a antígeno pueden producirse a través de técnicas de ADN recombinante o a

través de división enzimática o química de anticuerpos intactos. En algunas realizaciones, los fragmentos de unión antígeno incluyen Fab, F(ab)₂, Fab', F(ab')₂, F(ab')₃, Fd, Fv, anticuerpos de dominio (dAb), otros fragmentos monovalentes y divalentes, fragmentos de la región determinante de complementariedad (CDR), anticuerpos de cadena individual (por ejemplo, scFv, scFab, y scFabΔC), anticuerpos quiméricos, diacuerpos, triacuerpos, minicuerpos, nanocuerpos, y polipéptidos que contienen al menos una porción de un anticuerpo que es suficiente para conferir la unión de antígeno específica al polipéptido; y funciones y derivados de los anteriores. Véase, por ejemplo, Holliger y Hudson, *Nature Biotechnology* 23: 1 126-1 136 (2005) y Hust et al., *BMC Biotech* 7: 14 (2007).

Un "fragmento Fd" es un fragmento de anticuerpo que consiste en los dominios V_H y C_{H1}); un "fragmento Fv" consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo; un "fragmento scFv" es un anticuerpo de cadena individual que comprende una región variable de cadena pesada (V_H) y una región variable de cadena ligera (V_L) unida por un enlazador de péptido; un "fragmento scFab" es un anticuerpo de cadena simple que comprende un fragmento difícil (Fd) unido a una cadena ligera a través de un enlazador de péptido; un fragmento "scFabΔC" es una variante scFab sin cisteína (véase, por ejemplo, Hust et al., *supra*); y un "fragmento dAb" (anticuerpo de dominio simple) comprende un solo dominio variable (por ejemplo, un dominio V_H o V_L) (Ward et al., *Nature* 341 :544-546 (1989)). Además, también incluyen los diacuerpos y triacuerpos. Los diacuerpos y triacuerpos de la presente invención incluyen, por ejemplo, diacuerpos y triacuerpos homodiméricos y heterodiméricos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los dominios variables que forman un triacuerpo pueden unirse a tres epítopos diferentes o epítopos idénticos.

A menos que se declare lo contrario o en donde se implique lo contrario por contexto, un "anticuerpo" de la presente invención incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión antígeno de los mismos, derivados de anticuerpo o variantes que pueden contener una o más modificaciones (por ejemplo, una inserción, delección, sustitución, una modificación post-traducciona l o falta de la misma, de aminoácido, etc.), incluyendo conjugados de anticuerpo (es decir, anticuerpo o fragmentos de unión de antígeno de los mismos conjugados con o asociados a una fracción funcional). Los derivados de anticuerpo, incluyendo conjugados de anticuerpo, pueden basarse en o pueden comprender un fragmento de unión a antígeno de la invención que une específicamente CD154. Adicionalmente, las realizaciones de anticuerpo de la presente invención pueden ser anticuerpos de ratón (murinos), de hámster, de cabra, de conejo, quiméricos, humanizados, o completamente humanos, fragmentos, derivados o conjugados. Se entiende que en ciertos aspectos de la invención, el término "anticuerpo" puede excluir una o más de las realizaciones de anticuerpo descritas anteriormente; tales condiciones serán evidentes para el experto en la materia.

Los términos "pegilación", "polietilenglicol" o "PEG" incluyen un compuesto de polialquilen glicol o derivado del mismo, con o sin agentes de acoplamiento o derivatización con fracciones de acoplamiento o activación (por ejemplo, con tiol, triflato, tresilato, azirdina, oxirano, o preferentemente con una fracción de maleimida, por ejemplo, PEG-maleimida). Otros compuestos de polialquilen glicol apropiados incluyen, pero no se limitan a, maleimida monometoxi PEG, propilenglicol PEG activado, pero también polímeros cargados o neutrales de los siguientes tipos: dextrina, ácidos colomínicos, u otros polímeros con base en carbohidrato, polímeros de aminoácidos y biotina y otros derivados del reactivo de afinidad.

El término "función efectora" se refiere a la capacidad funcional de la región Fc o constante de un anticuerpo para unir proteínas y/o células del sistema inmune. Anticuerpos que tienen función efectora reducida y los métodos para modificarlos son bien conocidos en la técnica (Véase, por ejemplo, los documentos WO 05/18572, WO 05/03175, y US 6.242.195) y se describen con mayor detalle en el presente documento. Las funciones efectoras típicas incluyen la capacidad de unir una proteína de complemento (por ejemplo, la proteína complemento C11), y/o un receptor Fc (FcR) (por ejemplo, FcγRI, FcγRII, FcγRIIIa, FcγRIII, y/o FcγRIIIb). Las consecuencias funcionales de ser capaz de unir una o más de las moléculas anteriores incluyen, sin limitación, opsonización, fagocitosis, citotoxicidad celular dependiente de antígeno (ADCC), citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y/o modulación celular efectora. Una disminución en la función efectora se refiere a una disminución en una o más de las actividades bioquímicas o celulares inducidas al menos en parte por la unión de Fc a su receptor afín o a una proteína complementaria o célula efectora, mientras se mantiene la actividad de unión a antígeno de la región variable del anticuerpo (o su fragmento), a pesar de su afinidad de unión reducida, similar, idéntica o aumentada. Los anticuerpos particulares de la invención exhiben función efectora reducida. La disminución en la función efectora, por ejemplo, unión de Fc a un receptor Fc o proteína complementaria, puede expresarse en términos de reducción de veces (por ejemplo, reducida en 1,5 veces, 2 veces, y similares) y puede calcularse basándose en, por ejemplo, la reducción en porcentaje en la actividad de unión determinada utilizando ensayos de unión conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO 05/18572).

A menos que se requiera lo contrario por el contexto, los términos singulares deberán incluir pluralidades y los términos plurales deberán incluir el singular.

A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, la palabra "comprender" o variaciones tales como "comprende" o "comprendiendo" se entenderá que implica la inclusión de un número entero o grupo de números enteros manifestados pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

CD154

CD154 se conoce por muchos otros nombres en la técnica, tales como el ligando CD40 (CD30L), contra receptor CD40 (CD40CR), gp39, T-BAM, Molécula de Activación de Célula T, TRAF, Proteína de Activación Relacionada con TNF (TRAP), y Miembro 5 de la Superfamilia de Ligando del Factor de Necrosis Tumoral (TNFSF5) (Gauchat et al., 1993 FEBS Lett. 315: 259-266; Graf et al., 1992, Europ. J. Immun. 22: 3191-3194; Hollenbaugh et al., 1992 EMBO J. 11:4313-4321). Estos términos se utilizan de manera intercambiable a lo largo de esta solicitud. Las proteínas de unión a CD154, incluyendo los anticuerpos, de esta divulgación se unen específicamente al CD154 humano y pueden reaccionar de manera cruzada y por consiguiente unirse específicamente a CD154 de otras especies. En ciertas realizaciones, las proteínas de unión a CD154, incluyendo los anticuerpos, de esta invención se unen específicamente a CD154 de humano, CD154 de ratón o CD154 de primate no humano.

Anticuerpos Anti-CD154 y Proteínas de unión a CD154

La expresión "anticuerpo anti-CD154" como se utiliza en el presente documento se refiere a una molécula de inmunoglobulina que es capaz de unirse específicamente a un epítipo en un antígeno CD154. Los anticuerpos anti-CD154 pueden ser inmunoglobulinas intactas derivadas de fuentes naturales o de fuentes recombinantes y pueden ser porciones inmunoreactivas de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos son típicamente tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina.

Por consiguiente, como se hace referencia en todas las realizaciones y métodos de esta divulgación, un "anticuerpo anti-CD154" abarca (a menos que se indique lo contrario o se sugiera lo contrario por el contexto) un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo murino, un anticuerpo de hámster, un anticuerpo de cabra, un anticuerpo de conejo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo primatizado, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano (completo), un anticuerpo multimérico, un anticuerpo heterodimérico, un anticuerpo hemidimérico, un anticuerpo bi-, tri-, o tetravalente, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo de cadena simple (por ejemplo, scFv, scFab, and scFab Δ C), Bis-scFv, un diacuerpo, un triacuerpo o tetracuerpo, anticuerpos de dominio simple, y fragmentos Fab modificados. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD154 es un anticuerpo que comprende solamente un dominio simple de inmunoglobulina variable. Por consiguiente, los anticuerpos monovalentes incluyen anticuerpos que comprenden solamente un dominio variable de inmunoglobulina (es decir, una sola cadena variable ligera o pesada) y que se une específicamente a CD154. Además, los anticuerpos anti-CD154 de la invención pueden ser monovalentes, divalentes o multivalentes para CD154.

En ciertas realizaciones, una proteína de unión a CD154, por ejemplo un anticuerpo anti-CD154, con una función efectora reducida comprende cualquier porción de un anticuerpo anti-CD154 que es suficiente para mantener la unión específica al antígeno CD154. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender solamente un dominio de inmunoglobulina variable simple, un dominio V_H o V_L.

Por consiguiente, en ciertas realizaciones, una proteína de unión a CD154, por ejemplo un anticuerpo anti-CD154, es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, por ejemplo un fragmento de Fab, un fragmento de F(ab)₂, un fragmento de Fab¹, un fragmento de F(ab')₂, un fragmento de F(ab')₃, un fragmento de cadena simple de F(v) o un fragmento de F(v) y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores (véase, por ejemplo, Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9): 1126-1136). Los fragmentos de anticuerpo de la invención se describen con mayor detalle más adelante.

En un ejemplo, las proteínas de unión a CD154 o anticuerpos anti-CD154 son anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos del subtipo IgG4) o fragmentos (por ejemplo, fragmentos Fab¹) que poseen una región bisagra nativa o modificada. Han sido descritas numerosas regiones bisagra modificadas, por ejemplo, en los documentos US 5.677.425, WO 99/15549, y WO 98/25971. En otro ejemplo, los anticuerpos de la invención se modifican en sus regiones constantes como los anticuerpos descritos en WO 05/003169, WO 05/003170 y WO 05/003171. Cualquiera de los anticuerpos anti-CD154 antes mencionados, derivados de anticuerpo o fragmentos de anticuerpo pueden utilizarse para formar conjugados de anticuerpo de la presente invención. Cualquiera de los anticuerpos anteriores, fragmentos y conjugados pueden producir una función efectora reducida en comparación con un segundo anticuerpo anti-CD154.

Las moléculas del anticuerpo de la invención pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD o IgA) o subclases de moléculas de inmunoglobulina. Los dominios de región constante del anticuerpo, si están presente, pueden seleccionarse estando relacionados con la función propuesta de la molécula del anticuerpo. Por ejemplo, los dominios de la región constante pueden ser dominios IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humano. En particular, los dominios de la región constante de IgG humana pueden utilizarse, especialmente IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. Los isotipos IgG2 e IgG4 pueden utilizarse en ciertas realizaciones en donde la molécula del anticuerpo está pensada para usos terapéuticos para los cuales las funciones efectoras del anticuerpo reducidas o eliminadas son deseadas. Alternativamente, los isotipos IgG1 e IgG3 pueden utilizarse cuando la molécula del anticuerpo está pensada para propósitos terapéuticos para los cuales se requieren las funciones efectoras del anticuerpo.

En algunas realizaciones, una o más de las CDR de una proteína de unión a CD154, por ejemplo, un anticuerpo, de la invención puede incorporarse en uno o más dominios de inmunoglobulina, marcos universales, andamios de proteína u otras estructuras biocompatibles con base en andamios o esqueletos de proteína diferentes de los dominios de inmunoglobulina (Nygren & Uhlen, 1997, Curr. Opin. Strural Biol. 7:463-469; Saragovi et al., 1992, Bio/Technology

10:773-779; Skerra, 2000, J. Mol Recognition 13:167- 187). En ciertas realizaciones, las CDR de un anticuerpo anti-CD154 se incorporan en un marco universal (es decir, un marco que puede utilizarse para crear la variabilidad completa de las funciones, especificidades, o propiedades que están originalmente sostenidas por una gran colección de diferentes armazones, véase el documento U.S. 6.300.064). En otras realizaciones, los andamios alternativos (Véase, por ejemplo, Binz et al., 2005 Nat Biotech 23: 1257-1268 y Hosse et al., 2006 Protein Science 15: 14-27) pueden utilizarse para crear proteínas de unión a CD154 de la invención.

El término "anticuerpo anti-CD154" también abarca un anticuerpo sintético o un anticuerpo recombinante que se genera utilizando tecnología de ADN recombinante, tal como por ejemplo, una proteína expresada por un bacteriófago. El término "anticuerpo anti-CD154" deberá construirse para incluir un anticuerpo que ha sido generado mediante síntesis de una molécula de ADN que codifica para el anticuerpo y cuya molécula de ADN expresa una proteína de anticuerpo, o una secuencia de aminoácido que especifique el anticuerpo, en donde el ADN o la secuencia de aminoácido han sido obtenidas utilizando ADN sintético o tecnología de secuencia de aminoácido que está disponible y es bien conocida en la técnica.

En una realización, la invención proporciona un "anticuerpo anti-CD154" que es un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo monoclonal se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por mutaciones de origen natural posibles que pueden estar presentes en cantidades menores. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obteniéndose de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se construirá requiriendo la producción del anticuerpo a través de un método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a ser utilizados de acuerdo con la presente invención pueden producirse a través del método de hibridoma (murino o humano) descrito por Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), o pueden producirse a través de métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, US 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de colecciones de anticuerpo de fago utilizando las técnicas descritas en Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) y Marks et al., J Mol. Biol., 222:581-597 (1991), por ejemplo. También se entiende que ciertas realizaciones de la presente invención se refieren a composición que comprenden uno o más anticuerpos monoclonales diferentes que se unen específicamente a CD154, es decir, una composición de anticuerpo policlonal que comprende una pluralidad de anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de epítipo.

En otra realización de la invención, un "anticuerpo anti-CD154" se refiere a un anticuerpo que es un anticuerpo quimérico, o un derivado de anticuerpo o conjugado o fragmento de unión a antígeno del mismo. Típicamente, los anticuerpos quiméricos incluyen las regiones variables de cadena pesada y/o ligera, incluyendo tanto CDR como restos de marco, de una especie (típicamente ratón) fusionadas a regiones constantes de otras especies (típicamente humana). Estos anticuerpos de ratón/humano quiméricos contienen aproximadamente un 75 % de secuencias de aminoácido humanas y un 25 % de ratón. Las secuencias humanas representan las regiones constantes del anticuerpo, mientras que las secuencias de ratón representan las regiones variables (y por lo tanto contienen los sitios de unión a antígeno) del anticuerpo.

En otra realización, las proteínas de unión a CD154, los anticuerpos anti-CD154 de la invención incluyen anticuerpos, derivados de anticuerpo y fragmentos de unión a antígeno que comprenden un dominio variable que comprende regiones de marco de un anticuerpo, y regiones CDR de otro anticuerpo.

En una realización más específica, las proteínas de unión a CD154 y los anticuerpos anti-CD154 de esta invención incluyen anticuerpos quiméricos que comprenden regiones marco y regiones CDR de diferentes anticuerpos humanos.

Los métodos para formar los anticuerpos quiméricos descritos anteriormente son bien conocidos por un experto en la materia. Véase, por ejemplo, el documento US 5.807.715; Morrison et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci USA 81(21):6851-5; Sharon et al., (1984) Nature 309(5966):364-7; Takeda et al., (1985) Nature 314(6010):452-4.

En ciertas realizaciones de la presente invención, un anticuerpo anti-CD154 que une CD154 se genera a través del Método de Anticuerpo de Linfocito Seleccionado (SLAM) (Babcook et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci, 93, 7843-7848; WO 92/02551; de Wildt et al., 1997, J. Immunol. Methods, 207:61-67 y en Lagerkvist, et al., 1995, BioTechniques 18:862-869) que permite el aislamiento de cualquier especie de células que produce anticuerpos de alta afinidad durante respuestas inmunes *in vivo*. Otras técnicas incluyen aquellas descritas por Wildt et al., 1997, J. Immunol. Methods, 207:61-67 y Lagerkvist et al., 1995, BioTechniques 18(5):862-869. Los métodos anteriores se basan en el aislamiento de células productoras de anticuerpo individuales que después se expanden clonalmente seguido por clasificación de esos clones que producen anticuerpos anti-CD154 seguido por la posterior identificación de la secuencia de genes de cadena pesada (V_H) y ligera (V_L) variable. Un método de cribado particular se detalla en WO 04/051268. De esta forma, las células B que son positivas para anticuerpos para CD154 se aíslan. Las células B pueden ser de humano, ratón, rata, hámster, conejo, cabra u otras especies mamíferas. Los genes del anticuerpo en estas células B pueden clonarse y expresarse en una sola célula hospedadora, por ejemplo, a través de tecnología de ADN recombinante convencional. En ciertas realizaciones, la célula hospedadora es *E. coli*. Otras células hospedadoras se detallan a continuación. Los anticuerpos (que incluyen fragmentos de anticuerpo tal como los fragmentos Fab') expresadas en estas células pueden purificarse a través de medios convencionales. Si los anticuerpos son de una fuente no humana, se pueden humanizar a través de métodos convencionales, tal como a

través de mutagénesis de sus genes. Los anticuerpos humanizados pueden posteriormente expresarse en una célula hospedadora y pueden purificarse.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse a través de cualquier método conocido en la técnica tal como la técnica de hibridoma (Kohler & Milstein, *Nature*, 1975, 256:495-497), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de célula B humana (Kozbor et al., *Immunology Today*, 1983, 4, 72) y las técnicas de hibridoma EBV (Cole et al., "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985). Los métodos para crear y fabricar anticuerpos recombinantes son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, US 4.816.397; US 6.331.415; Simmons et al., 2002, *Journal of Immunological Methods*, 263, 133-147; WO 92/02551; Orlandi et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 3833; Riechmann et al., 1988, *Nature*, 322, 323; US 5.585.089; WO91/09967; Mountain y Adair, 1992, *Biotechnol. Eng. Rev.*, 10, 1-142; Verma et al., 1998, *J. Immunol. Methods*, 216:165-181; Holliger and Hudson, 2005, *Nature Biotech.* 23(9): 1126-1136).

Los anticuerpos de la presente invención también se pueden generar utilizando varios métodos de visualización de fago conocidos en la técnica e incluyen aquellos descritos por Brinkman et al., 1995, *J. Immunol. Methods*, 182:41-50; Ames et al., 1995, *J. Immunol. Methods*, 184, 177-186; Kettleborough et al., 1994, *Eur. J. Immunol.*, 24, 952-958; Persic et al., 1997, *Gene*, 187, 9-18; y Burton et al., 1994, *Advances in Immunol.*, 57, 191-280; documentos WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/1 1236; WO 95/15982; and WO 95/20401; y US 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743; y 5.969.108.

También, los ratones transgénicos (por ejemplo, genéticamente modificados), u otros organismos, incluyendo otros mamíferos, pueden utilizarse para producir proteínas de unión y anticuerpos de esta invención (véase, por ejemplo, el documento US 6.300.129). Por ejemplo, se sabe que los ratones modificados para reemplazar solamente las regiones variables de loci inmunes de ratón (cadena pesada V, D y los segmentos J, y la cadena ligera V y los segmentos J) con secuencias variables humanas correspondientes pueden emplearse para producir grandes cantidades de anticuerpos de alta afinidad con secuencias variables humanas (véase, por ejemplo, los documentos US 6.586.251; US 6.596.541 y US 7.105.348).

En otra realización de esta invención un "anticuerpo anti-CD154" se refiere a un anticuerpo, derivado o conjugado de anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno que se primatiza o humaniza. Los anticuerpos primatizados y humanizados típicamente incluyen CDR de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo murino injertado en un marco de la región V del anticuerpo de primate no humano o humano, usualmente además comprendiendo una región constante humana. Véase, por ejemplo, Riechmann *et al.*, (1988) *Nature* 332:323-327; US 6.054.297; 5.821.337; 5.770.196; 5.766.886; 5.821.123; 5.869.619; 6.180.377; 6.013.256; 5.693.761; y 6.180.370.

La base lógica para utilizar los anticuerpos primatizados humanizados es retener la especificidad del antígeno (humano) del anticuerpo de ratón conferido por las CDR de ratón pero reducir la inmunogenicidad del anticuerpo de ratón (un anticuerpo de ratón causaría una respuesta inmune contraria en las especies diferentes del ratón) mediante el uso de tantas secuencias marco humanas como sea posible. Dichos anticuerpos pueden utilizarse en terapias humanas para minimizar o eliminar los efectos secundarios indeseados, tales como respuestas inmunes. Los anticuerpos que comprenden CDR donadoras injertadas de anticuerpos no humanos específicos de antígeno sobre marcos aceptores de primate no humano homólogos que tienen inmunogenicidad reducida en humanos han sido descritos (documentos US 2005/0208625; US 2002/0062009; US 7.338.658).

Por consiguiente, las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murino) son inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de éstas (tales como Fv, Fab, Fab¹, F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpo) que contienen secuencias derivadas de inmunoglobulina no humana y secuencias de inmunoglobulina humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en donde los restos de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo receptor se reemplazan por restos de las CDR de especies no humanas (anticuerpo donador) tal ratón, rata o conejo que tienen la especificidad deseada, afinidad y capacidad. En algunas instancias, los restos de la región de estructura Fv (FR) de la inmunoglobulina humana están reemplazados por restos FR no humanos correspondientes.

Además, el anticuerpo humanizado puede comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las CDR importadas o las secuencias FR. Estas modificaciones se realizan para refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado puede comprender sustancialmente todos o al menos un, y típicamente 2, dominios variables, en donde todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de la inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los restos FR son los de la secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también puede comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente de una inmunoglobulina humana.

Un anticuerpo humanizado (que incluye, por ejemplo, fragmentos de anticuerpo, y derivados o conjugados de un anticuerpo) puede producirse a través de tecnología de ADN recombinante, en donde algunos o todos los aminoácidos

en la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina humana que no son requeridos para la unión del antígeno (por ejemplo, la región constantes y las regiones marco de los dominios variables) se utilizan para sustituir los aminoácidos correspondientes de la cadena ligera o pesada del anticuerpo no humano afin. Los métodos para hacer anticuerpos humanizados son bien conocidos por el experto en la materia de los anticuerpos. Véase, por ejemplo, EP 239400; Jones et al., (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al., (1988) Nature 332:323-327; Verhoeven et al., (1988) Science 239:1534-1536; Queen et al., (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:10029; Orlandi et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833; US 6.180.370, y EP 519596, que describe el anticuerpo que cubre los restos de la superficie.

Por consiguiente, en una realización de esta invención, un anticuerpo anti-CD154 se refiere a un anticuerpo humanizado (que incluye sin limitación un fragmento de unión a antígeno humanizado y un derivado de anticuerpo humanizado o un conjugado), que se genera a través del trasplante de CDR murino o de rata (u otro no humano) sobre un anticuerpo humano. Más específicamente, esta humanización se logra como sigue: (1) los ADNc que codifican dominios variables de cadena ligera y pesada se aíslan de un hibridoma o una célula B que secreta el anticuerpo; (2) las secuencias de ADN de los dominios variables, incluyendo las CDR, se determinan mediante secuenciación; (3) los ADN que codifican las CDR se transfieren a las regiones correspondiente de un dominio variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo humano que codifica la secuencia a través de mutagénesis dirigida al sitio; y (4) los segmentos del gen de la región constante humana de un isotipo deseado (por ejemplo, 1 para CH y k para CL) se añaden. Finalmente, los genes de cadena pesada y ligera humanizados se co-expresan en células hospedadoras de mamífero (por ejemplo, células CHO o NS0) para producir el anticuerpo humanizado soluble.

En ocasiones, la transferencia directa de CDR a un marco humano conduce a una pérdida de la afinidad de unión a antígeno de la proteína o anticuerpo de unión resultante. La pérdida de la afinidad de unión a antígeno puede ocurrir porque en algunos anticuerpos afines, ciertos aminoácidos dentro de las regiones marco interactúan con las CDR y de esta forman influyen en la afinidad de unión a antígeno general del anticuerpo. En tales casos, el experto en la materia apreciará que sería crítico introducir "mutaciones de respaldo" en las regiones de marco del anticuerpo aceptor con el fin de retener la actividad de unión a antígeno del anticuerpo afin. Los métodos generales para producir mutaciones de respaldo son bien conocidos por el experto en la materia. Véase, por ejemplo, Queen *et al.*, (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:10029; Co *et al.*, 1991. Proc. Nat. Acad. Sci USA 88:2869-2873; WO 90/07861; Tempest 1991. Biotechnology 9: 266-271. Las mutaciones de respaldo ejemplares para anticuerpos de la presente invención incluyen aquellos restos representados en la Figura 9 bajo el contenido de donador.

En ciertas realizaciones la proteína o anticuerpo de unión de la presente divulgación puede comprender un dominio V_H que no es un dominio variable de inmunoglobulina murina o de camélido. En ciertas realizaciones el polipéptido del anticuerpo puede comprender un dominio V_H que no contiene uno o más aminoácidos que son específicos para dominios variables de inmunoglobulina de camélido en comparación con los dominios V_H humanos.

En una realización de esta divulgación, un "anticuerpo anti-CD154" se refiere a un anticuerpo (que incluye un fragmento de unión a antígeno y un derivado o conjugado de anticuerpo) que es completamente humano. Un anticuerpo complementamente "humano" comprende un polipéptido de anticuerpo o un dominio variable de inmunoglobulina que tiene una secuencia derivada de una inmunoglobulina humana (por ejemplo, obtenida de una secuencia de codificación de inmunoglobulina). El término "anticuerpos humanos" incluye, por ejemplo, anticuerpos que tienen regiones variables y constantes (si están presentes) derivadas de las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. El término "humano" como se aplica en el presente documento para un anticuerpo o para un fragmento tal como un dominio variable no abarca un anticuerpo de otras especies, por ejemplo, ratón, que ha sido "humanizado" a través del injerto de las secuencias de región constante humanas en el polipéptido del anticuerpo (es decir, reemplazando regiones constantes no humanas con regiones constantes humanas) o a través del injerto de secuencias marco de la región V humana en un dominio variable de inmunoglobulina de un mamífero no humano (es decir, reemplazando las regiones marco no humanas del dominio V con regiones marco humanas). Han sido descritos métodos para humanizar regiones variables de inmunoglobulina a través de la modificación racional de los restos de determinación de complementariedad (documento US 2006/0258852).

Los anticuerpos humanos pueden, en ciertas realizaciones, incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por una mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). En ciertas realizaciones, por consiguiente, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-CD154 que comprende un dominio variable que tiene una o más regiones marco (por ejemplo, FW1, FW2, FW3, y/o FW4) que comprenden una secuencia de aminoácido que es igual a la secuencia de aminoácido de la región marco correspondiente codificada por un segmento de gen de anticuerpo de línea germinal humana, o las secuencias de aminoácido de una o más dichas regiones marco colectivamente comprendiendo hasta 5 diferencias de aminoácido con relación a la secuencia de aminoácido de dicha región marco correspondiente codificada por un segmento del gen de anticuerpo de línea terminal humana. En realizaciones adicionales, las secuencias de aminoácido de las regiones marco (FW1, FW2, FW3, y FW4) de un dominio variable son iguales que las secuencias de aminoácido de las regiones marco correspondientes codificadas por un segmento del gen de anticuerpo de línea germinal humana, o las secuencias de FW1, FW2, FW3, y FW4 colectivamente conteniendo hasta 10 diferencias de aminoácido en relación a las secuencias de las regiones marco correspondientes codificadas por el segmento del gen de anticuerpo de línea germinal humana. Los segmentos del gen de anticuerpo de línea germinal ilustrativos incluyen, por ejemplo, DP47, DP45, DP48, y DPK9 (documento US

2006/0062784), y segmentos que codifican las secuencias marcoceptoras descritas en los ejemplos y figuras.

En algunas realizaciones, el anticuerpo humano (que incluye un fragmento de anticuerpo o secuencia de dominio variable) tiene al menos 85 % de identidad de secuencia de aminoácido (incluyendo, por ejemplo, 87 %, 90 %, 93 %, 95 %, 97 %, 99 % o más de identidad de secuencia) con un anticuerpo humano de origen natural.

Los anticuerpos completamente humanos o humanos pueden derivarse de ratones transgénicos (por ejemplo, genéticamente modificados tales como knock-in) portadores de genes de anticuerpo humano (llevan los exones de variable (V), diversidad (D), unión (J) y constante (C)) o unas regiones V, D y J humanas de las células humanas. Por ejemplo, ahora es posible producir animales genéticamente modificados (por ejemplo, ratones) que son capaces, después de la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en la ausencia de la producción de inmunoglobulina endógena (véase, por ejemplo, Jakobovits et al., PNAS, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993); y Duchosal et al., Nature 355:258 (1992). Una cepa de ratón transgénica (por ejemplo genéticamente modificada incluyendo un reemplazo de gen activado, desactivado, y similar) puede modificarse para contener secuencias de genes de inmunoglobulina humanos sin configurar. Las secuencias humanas pueden codificar tanto la cadena pesada como ligera de anticuerpos humanos y funcionarán correctamente en los ratones, que experimentan reconfiguraciones para proporcionar un amplio repertorio de anticuerpos similar al de los humanos. Los ratones genéticamente modificados pueden inmunizarse con la proteína diana (por ejemplo, CD154, sus fragmentos, o células que expresan CD154) para crear una colección diversa de anticuerpos específicos y su ARN de codificación. Los ácidos nucleicos que codifican los componentes de la cadena de dichos anticuerpos después pueden clonarse del animal en un vector de despliegue. Típicamente las poblaciones separadas de ácidos nucleicos que codifican secuencias de cadena pesada y ligera se clonan, y las poblaciones separadas después se recombinan en la inserción en el vector, de tal forma que cualquier copia dada de un vector recibe una combinación aleatoria de una cadena pesada y ligera. El vector se diseña para expresar cadenas de anticuerpos de tal forma que pueden ensamblarse y desplegarse en la superficie exterior del paquete de despliegue que contiene el vector. Por ejemplo, las cadenas de anticuerpo pueden expresarse como proteínas de fusión con una proteína de capa de fago de la superficie exterior del fago. A continuación, los paquetes de despliegue pueden cribarse para desplegar la unión de los anticuerpos a la diana.

Además, los anticuerpos humanos pueden derivarse de colecciones de visualización de fago (Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Vaughan *et al.*, Nature Biotech 14:309 (1996), US 6.300.064). Pueden crearse colecciones de fagos sintéticos mediante el uso de combinaciones aleatorias de regiones V de anticuerpo humano sintético. Mediante la selección del antígeno, se pueden crear anticuerpos completamente humanos en donde las regiones V son muy de tipo humano en naturaleza. Véase, US 6.794.132, 6.680.209, 4.634.666, y Ostberg *et al.*, (1983), Hybridoma 2:361-367.

Para la generación de anticuerpos humanos, también ver Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156 (1997), Green y Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495 (1998). Los anticuerpos humanos se explican y delimitan adicionalmente en U.S. 5.939.598 y 6.673.986. También ver U.S. 6.114.598, 6.075.181 y 6.162.963. Véase también US 6.150.584, US 6.713.610, US 6.657.103, US 2003/0229905 AI, US 2004/0010810 AI, US 2004/0093622 AI, US 2006/0040363 AI, US 2005/0054055 AI, US 2005/0076395 AI y US 2005/0287630 AI. Véase también EP 0463151 B1, WO 94/02602, WO 96/34096, y WO 98/24893.

En un método alternativo, otros han utilizado un método "minilocus". En el método de "minilocus", un locus Ig exógeno se emula a través de la inclusión de piezas (genes individuales) del locus Ig. De esta forma, uno o más genes VH, uno o más genes DH, uno más genes JH, una región *mu* constante, y una segunda región constante (preferentemente una región constante gamma) se forman en el constructo para la inserción en un animal. Este método se describe en, por ejemplo, US 5.545.807, 5.545.806, 5.625.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650, 5.814.318, 5.591.669, 5.612.205, 5.721.367, 5.789.215, y 5.643.763. También ver US 5.569.825, 5.877.397, 6.300.129, 5.874.299, 6.255.458, y 7.041.871, las descripciones de las cuales se incorporan aquí por referencia en su totalidad. Véase también EP 0546073, WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852, y WO 98/24884. Además, véase Taylor et al., (1992 Nuc. Acids. Res., 20: 6287), Chen et al., (1993 Int. Immunol. 5: 647), Tuaille et al., (1993 PNAS USA. 90: 3720-4), Choi et al., (1993 Nature Genetics 4:117), Lonberg et al., (1994 Nature 368: 856-859), Taylor et al., (1994 International Immunology 6: 579-591), y Tuaille et al., (1995 J Immunol. 154: 6453-65), Fishwild et al., (1996 Nature Biotechnology 14:845), y Tuaille et al., (2000 Eur J Immunol. 10: 2998-3005).

En una realización particular de esta invención, los anticuerpos completamente humanos se preparan utilizando esplenocitos humanos primados *in vitro* (Boerner et al, 1991. J. Immunol. 147:86-95).

En una realización más particular de esta invención, los anticuerpos completamente humanos se preparan a través de la clonación del repertorio (Persson et al., 1991. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88:2432-2436; Huang y Stollar 1991. J. Immunol. Methods 141:227- 236). Además, US 5.798.230 describe la preparación de anticuerpos monoclonales humanos de células B humanas, en donde las células B productoras del anticuerpo humano se immortalizan a través de la infección con un virus Epstein-Barr, o uno de sus derivados, que expresa el antígeno 2 nuclear del virus Epstein-Barr ("EBNA2"), una proteína requerida para la immortalización. La función EBNA2 posteriormente se desactiva, dando

como resultado un aumento en la producción del anticuerpo.

Otros métodos para producir anticuerpos completamente humanos implican el uso de animales no humanos que tienen un locus Ig endógeno inactivado y son transgénicos para los genes de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo humano sin configurar. Los animales transgénicos pueden inmunizarse con células o la proteína D1.1 (US 5.474.771; 6.331.433; y 6.455.044) e hibridomas que pueden generarse de las células B derivadas de éstos. Los detalles de estos métodos se describen en la técnica. Véase, por ejemplo, varias publicaciones/patentes referentes a los ratones transgénicos que contienen un locus Ig humano, incluyendo US 5.789.650; varias publicaciones/patentes con respecto a los ratones XENOMOUSE®, incluyendo US 6.075.181; 6.150.584; y 6.162.963; Green, 1997, Nature Genetics 7: 13-21; Mendez, 1997, Nature Genetics 15: 146-56; y las publicaciones/patentes que se refieren a ratones "transómicos" incluyendo EP 843961 y Tomizuka, 1997, Nature Genetics 16: 1433-43.

Las proteínas de unión a CD154 y los anticuerpos anti-CD154 de la presente invención también se refieren a las proteínas o anticuerpos de unión de bloqueo cruzado, o a proteínas de unión o anticuerpos que se unen al mismo epítipo o que se unen a un epítipo estrechamente relacionado o solapado como cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. Una proteína o anticuerpo de unión de bloqueo cruzado puede inhibir o bloquear competitivamente la unión de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones, la invención proporciona proteínas de unión a CD154 y anticuerpos anti-CD154 que se unen al mismo epítipo como lo hace un anticuerpo humanizado que comprende una secuencia de cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13 y que comprende una secuencia de cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 15 (342 Fab y fragmentos Fab'), y que exhiben propiedades de unión a CD154 similares en ensayos de competencia con un anticuerpo anti-CD154 5c8, como se describe en el presente documento. En otras realizaciones, la invención proporciona proteínas de unión a CD154 y anticuerpos anti-CD154 que se unen al mismo epítipo como lo hace el anticuerpo humanizado que comprende la secuencia del dominio V_L de acuerdo con SEQ ID NO: 58 y una secuencia del dominio V_H de acuerdo con SEQ ID NO: 60 (secuencias variables del anticuerpo 338), y que exhiben proteínas de unión a CD154 similares en ensayos de competencia con el anticuerpo anti-CD154 5c8, como se describe en el presente documento.

En ciertas realizaciones de la presente invención, una proteína de unión a CD154, por ejemplo el anticuerpo anti-CD154, exhibe alta afinidad para el CD154 humano. Por ejemplo en ciertas realizaciones, la proteína de unión a CD154 se disocia del CD154 humano (CD40L humano) con un K_D en el intervalo de 50 nM a 1 pM, inclusive, como se determina por las resonancia de plasmón de superficie (por ejemplo Biacore®). Por ejemplo, el K_D para el CD154 humano puede ser de 25 nM a 1 pM, 10 nM a 1 pM, 5 nM a 1 pM, 1 nM a 1 pM, 0,5 nM a 1 pM, 0,1 nM a 1 pM, 75 pM a 1 pM, 50 pM a 1 pM, 20 pM a 1 pM, o aún de 10 pM a 1 pM. En otras realizaciones, una proteína de unión a CD154 de la presente invención se disocia del CD154 humano con un K_D en el intervalo de 500 pM a 1 pM, inclusive, como se determina por la resonancia de plasmón de superficie (por ejemplo, Biacore®). En algunas realizaciones, el K_D para el CD154 humano es menor de 50 pM. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente invención, una proteína de unión a CD154 se disocia del CD154 humano con un K_D que es menor de 20 pM, en algunas realizaciones de la presente invención, una proteína de unión a CD154 se disocia del CD 154 humano con un K_D que es menor de 10 pM. En ciertas realizaciones, una proteína de unión a CD154 de la invención se une a CD154 con alta afinidad pero no desplaza la unión de CD154 de CD40. La afinidad del anticuerpo puede mejorarse mediante métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Clark et al., 2006 Protein Sci. 15(5):949-60, que describen la mejora de la afinidad de un anticuerpo utilizando un diseño computacional con base en el marco, y Chao et al., 2006 Nat Protoc 1:755-768, que describe métodos para aislar y modificar scFvs con propiedades deseadas utilizando despliegue de superficie de levadura).

Cuando se desea mejorar la afinidad de los anticuerpos de la invención que contienen unas o más de las CDR antes mencionadas, los anticuerpos con una afinidad mejorada pueden obtenerse a través distintos protocolos de maduración y afinidad, incluyendo pero no limitándose a mantener las CDR (Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), organización de cadena (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), el uso de cepas de mutación de *E. coli* (Low et al., J. Mol. Biol., 250, 350-368, 1996), organización de ADN (Patten et al, Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), visualización de fago (Thompson et al., J. Mol. Biol, 256, 7-88, 1996) y PCR sexual (Cramer, et al., Nature, 391, 288-291, 1998). Todos estos métodos de modulación de afinidad son explicados por Vaughan et al., (Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998). De esta forma, la invención también proporciona variantes de secuencia de los anticuerpos de la invención que se unen específicamente a CD154. Las variantes de secuencia comprenden una o más sustituciones semi-conservadas o conservadas dentro de las secuencias y las sustituciones preferentemente no afectan de manera significativa la actividad deseada del polipéptido. Las sustituciones pueden ser de origen natural o pueden introducirse por ejemplo utilizando mutagénesis (por ejemplo, Hutchinson et al., 1978, J. Biol. Chem. 253:6551). Los aminoácidos glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina, por ejemplo, por lo general pueden intercambiarse (aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas). De estas posibles sustituciones, se prefiere que glicina y alanina se sustituyan entre sí (ya que tienen cadenas laterales relativamente cortas) y la valina, leucina e isoleucina se utilizan para sustituirse entre sí (ya que tienen grandes cadenas laterales que son hidrófobas). Otros aminoácidos que por lo general pueden sustituirse entre sí incluyen pero no se limitan a:

- fenilalanina, tirosina, y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas);
- lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas);

- aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas);
- asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales de amina);
- cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre).

5 La afinidad de unión de las proteínas de unión a CD154, por ejemplo de los anticuerpos anti-CD154, de la presente divulgación también se pueden describir con relación a los términos o en comparación con la afinidad de unión a un segundo anticuerpo que también se une específicamente a CD154 (por ejemplo, un segundo anticuerpo anti-CD154 que es específico de CD154, que puede referirse en el presente documento como un "segundo anticuerpo específico de CD154". En algunas realizaciones, el segundo anticuerpo específico de CD154 puede ser el anticuerpo 5c8 (producido por hibridoma depositado con el N.º de Acceso HB 10916 ATCC, como se describe en US 5.474.771) o humanizado 5c8). En otras realizaciones, el segundo anticuerpo específico de CD154 puede ser cualquiera de los anticuerpos de la divulgación, tal como 342, 381, 338, 294, 295, 300, 335, 303 o 402 (Figura 12). Por consiguiente, ciertas realizaciones de la presente invención se refieren a un anticuerpo anti-CD154 que se une a CD154 humano con mayor afinidad que el anticuerpo 5c8, o con un K_D menor que el K_D del anticuerpo 5c8. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-CD154 de la presente divulgación también inhibe la actividad de CD154 o bloquea la interacción CD154:CD40 en un grado mayor al que lo hace un segundo anticuerpo específico de CD154, tal como 5c8, a concentración equimolares. La capacidad relativa de un anticuerpo anti-CD154 para bloquear la interacción CD154:CD40 puede medirse a través de cualquier ensayo disponible, tal como, por ejemplo, el ensayo de regulación positiva ICAM-1 descrito en el presente documento y los ensayos de competición de unión.

20 Por consiguiente, en ciertas realizaciones, las proteínas de unión a CD154 y los anticuerpos anti-CD154 (incluyendo fragmentos y derivados de anticuerpos) de la invención son útiles para inhibir la unión de CD154 a CD40 y lo hacen con una alta especificidad, por ejemplo, con un IC50 en la escala de 10 pM a 1,5 μ M, inclusive. En ciertas realizaciones, las proteínas de unión a CD154, por ejemplo, los anticuerpos, de la invención pueden tener un IC50 en el intervalo de 10 pm a 500 pm, 50 pm a 500 pm, 100 pm a 500 pm, 250 pm a 750 pm, 500 pm a 1 μ M o 750 pm a 1,5 μ M. En realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-CD154 no acaba sustancialmente con la actividad de CD40 ni activa la señalización de CD40. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD154 de la presente invención antagoniza una actividad de CD154 o CD40 o ambos.

30 Ciertas realizaciones de la presente divulgación, por consiguiente, se refieren a proteínas de unión a CD154 y anticuerpo anti-CD154 que unen el CD154 humano con mayor o igual afinidad en relación a un segundo anticuerpo específico de CD154 (por ejemplo, el anticuerpo 5c8 o 5c8 humanizado) o con un K_D que es menor que o igual al K_D de un segundo anticuerpo específico de CD154, en donde el anticuerpo anti-CD154 no inhibe sustancialmente la interacción CD154:CD40 con relación al segundo anticuerpo específico de CD154. Los anticuerpos pueden ser útiles como reactivos en ensayos de unión y de diagnóstico, por ejemplo. Los anticuerpos ilustrativos que exhiben una alta afinidad a CD154 humano pero un grado inferior de inhibición CD154:CD40 en comparación con un segundo anticuerpo específico de CD154 son los anticuerpos 381 y 338 descritos en el presente documento. Por ejemplo, la presente invención proporciona anticuerpos anti-CD154 que se unen específicamente a CD154 humano con una afinidad mayor o igual (con relación a un segundo anticuerpo específico de CD154, tal como 5c8 humanizado, por ejemplo) pero que bloquean la interacción CD154:CD40 en menor grado que el segundo anticuerpo específicamente de CD154. En realizaciones adicionales, estos anticuerpos anti-CD154 que inhiben la unión de CD154 (CD40L) a CD40 en menor grado que un segundo anticuerpo específico de CD-154 tampoco acaban sustancialmente con la actividad de CD40 o la activación de la señalización de CD40. Por ejemplo, los anticuerpos, si se administran en un ensayo de potencia *in vitro* como se describe en el Ejemplo 7, pueden no exhibir ninguna agonización estadísticamente significativa sobre un tratamiento de control o pueden exhibir 1 %, 2 %, 3 %, 5 % o 10 % de agonización en comparación con un control positivo (por ejemplo, el ligando CD154). Vidalain *et al.*, (The EMBO Journal (2000) 19:3304-3313) y Pearson *et al.*, (International Immunology (2001) 13:273-283) describen la trayectoria de señalización de CD40 y también proporcionan ensayos que pueden utilizarse para determinar si la interacción CD154-CD40 se bloquea o inhibe, y en qué grado.

50 En algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-CD154 que comprende al menos una CDR seleccionada de CDR-H1 (SEQ ID NO: 3), CDR-H2 (SEQ ID NO: 4) y CDR-H3 (SEQ ID NO: 5). Preferentemente, el anticuerpo comprende al menos dos CDR seleccionadas de CDR-H1 (SEQ ID NO: 3), CDR-H2 (SEQ ID NO: 4) y CDR-H3 (SEQ ID NO: 5) y más preferentemente, las tres CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3.

55 En otra realización, el anticuerpo anti-CD 154 de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada de CDR-L1 (SEQ ID NO: 6), CDR-L2 (SEQ ID NO: 7) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 8). Preferentemente, el anticuerpo comprende al menos dos CDR seleccionada de CDR-L1 (SEQ ID NO: 6), CDR-L2 (SEQ ID NO: 7) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 8) y más preferentemente, las tres CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3.

60 En realizaciones adicionales, el anticuerpo comprende las tres CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 (SEQ ID NO: 3-5) y las tres CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 (SEQ ID NO: 6-8).

65 En realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-CD154 comprende una secuencia de cadena pesada variable de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 9, 10 o 11 y comprende la secuencia de cadena ligera variable de acuerdo con SEQ ID NO: 2 o 14.

- 5 En algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-CD 154 que comprende al menos una CDR seleccionada de CDR-H1 (SEQ ID NO: 42), CDR-H2 (SEQ ID NO: 43) y CDR-H3 (SEQ ID NO: 44). Preferentemente, el anticuerpo comprende al menos dos CDR seleccionada de CDR-H1 (SEQ ID NO: 42), CDR-H2 (SEQ ID NO: 43) y CDR-H3 (SEQ ID NO: 44) y más preferentemente las tres CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3.
- 10 En otra realización, el anticuerpo anti-CD154 de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada de CDR-L1 (SEQ ID NO: 45), CDR-L2 (SEQ ID NO: 46) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 47). Preferentemente, el anticuerpo comprende al menos dos CDR seleccionada de CDR-L1 (SEQ ID NO: 45), CDR-L2 (SEQ ID NO: 46) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 47) y más preferentemente las tres CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3.
- 15 En realizaciones adicionales, el anticuerpo comprende las tres CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 (SEQ ID NO: 42-44) y las tres CDR-L1, CDR-L2 and CDR-L3 (SEQ ID NO: 45-47).
- En realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-CD154 comprende una secuencia de cadena pesada o variable de acuerdo con SEQ ID NO: 56 y/o comprende una secuencia de cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 54.
- 20 En algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-CD 154 que comprende al menos una CDR seleccionada de CDR-H1 (SEQ ID NO: 48), CDR-H2 (SEQ ID NO: 49) y CDR-H3 (SEQ ID NO: 50). Preferentemente, el anticuerpo comprende al menos dos CDR seleccionada de CDR-H1 (SEQ ID NO: 48), CDR-H2 (SEQ ID NO: 49) y CDR-H3 (SEQ ID NO: 50) y más preferentemente las tres CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3.
- 25 En otra realización, el anticuerpo anti-CD154 de la divulgación comprende al menos una CDR seleccionada de CDR-L1 (SEQ ID NO: 51), CDR-L2 (SEQ ID NO: 52) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 53). Preferentemente, el anticuerpo comprende al menos dos CDR seleccionada de CDR-L1 (SEQ ID NO: 51), CDR-L2 (SEQ ID NO: 52) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 53) y más preferentemente las tres CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3.
- 30 En ciertas realizaciones, los anticuerpos tienen una secuencia complementaria que comprende una o más CDR de cadena ligera de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, mencionadas anteriormente, o una secuencia complementaria que comprende una o más CDR de cadena pesada de CDR o CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, mencionadas anteriormente, respectivamente. De esta forma, en ciertas realizaciones, un anticuerpo de esta divulgación comprende CDR-H1 (SEQ ID NO: 48), CDR-H2 (SEQ ID NO: 49) o CDR-H3 (SEQ ID NO: 50), y CDR-L1 (SEQ ID NO: 51), CDR-L2 (SEQ ID NO: 52) o CDR-L3 (SEQ ID NO: 53).
- 35 En realizaciones adicionales, el anticuerpo comprende las tres CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 (SEQ ID NO: 48-50) y las tres CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 (SEQ ID NO: 51-53).
- 40 En realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-CD154 comprende una secuencia de cadena pesada variable de acuerdo con SEQ ID NO: 60 y/o comprende una secuencia de cadena ligera variable de acuerdo con SEQ ID NO: 58.
- 45 En ciertas realizaciones, la proteína de unión a CD154 de esta divulgación comprende una secuencia de cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 62 y una secuencia de cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 65. En otras realizaciones, la proteína de unión a CD154 de esta invención comprende una secuencia de cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 63 y una secuencia de cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 66.
- 50 En ciertas realizaciones, la proteína de unión a CD154 de esta divulgación comprende una secuencia de cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 68 y una secuencia de cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 71. En otras realizaciones, la proteína de unión a CD154 de esta divulgación comprende una secuencia de cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 69 y una secuencia de cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 72. En otras realizaciones, la proteína de unión a CD154 comprende una de las secuencias de acuerdo con SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71 o SEQ ID NO: 72.
- 55 Esta divulgación también proporciona proteínas de unión a CD154 que preferentemente comparten al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 % o 94 % de identidad con una proteína de unión a CD154 de la divulgación. Más preferentemente, una proteína de unión a CD154 comparte al menos un 95 %, 96 %, 97 % o 98 % de identidad. Más preferentemente, una proteína de unión a CD154 comparte al menos un 99 %, 99,5 %, 99,9 % o más de identidad con una proteína de unión a CD154 de unión. Las proteínas de unión a CD154 de la divulgación pueden comprender una secuencia de dominio variable que al menos es idéntica en un 85 % a un dominio variable de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58 o SEQ ID NO: 60, o una o más CDR de la misma.
- 60 Otras realizaciones de la invención se refieren a anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados que tienen especificidad de unión a al menos dos antígenos diferentes. Estos pueden utilizarse solos o mezclados en composiciones que comprenden poblaciones policlonales. En la presente invención, una de las especificidades de unión es para el antígeno CD154, mientras la otra especificidad de unión es para cualquier otro antígeno, y preferentemente para una proteína de superficie celular
- 65

o receptor, o subunidad receptora. Por ejemplo, la otra especificidad de unión puede ser un ligando seleccionado de entre albúmina de suero humano (HSA), TNF α , IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, IFN- γ , CD2, CD4, CD8, CTLA4, LFA1, LFA3 y VLA4.

5 En otras realizaciones de la presente invención, un anticuerpo anti-CD154 comprende un sitio de unión de ligando genérico. Un ligando genérico (por ejemplo, un polipéptido) es capaz de unir miembros funcionales de un repertorio independientemente de la especificidad del ligando diana. Un ligando genérico puede por consiguiente utilizarse para identificar o seleccionar (por ejemplo, como en un procedimiento de purificación y filtración) miembros funcionales de un repertorio (tal como una colección o grupo de anticuerpos, independientemente de las especificidades de unión del antígeno de los anticuerpos). Los ligandos genéricos incluyen, por ejemplo, proteína A con proteína V y proteína L. La pre-selección de los miembros de una colección de fago o ligandos genéricos se describe en el documento WO 99/20749.

15 Fragmentos de Anticuerpo

La presente invención también se refiere a fragmentos de anticuerpo anti-CD154 de unión a antígeno o de unión a epítipo. Todos los métodos y reactivos descritos anteriormente con respecto a los anticuerpos anti-CD154 pueden utilizarse de manera similar para producir y utilizar los fragmentos de anticuerpo anti-CD154 de esta invención.

20 En algunas realizaciones de esta invención, los fragmentos de anticuerpo anti-CD154 incluyen complejos de anticuerpo heteroméricos y fusiones de anticuerpo, tales como anticuerpos biespecíficos, anticuerpos hemidiméricos, anticuerpos multivalentes (es decir, anticuerpos tetravalentes) y anticuerpos de cadena individual. Un anticuerpo hemidimérico se forma por una porción Fc y una porción Fab. Un anticuerpo de cadena individual se forma por regiones variables enlazadas por separadores de proteína en una cadena de proteína individual.

25 En algunas realizaciones de esta invención, los fragmentos de anticuerpo anti-CD154 también incluyen proteínas que contienen una o más cadenas ligeras y/o cadenas pesadas de inmunoglobulina, tales como monómeros y homo- o hetero-multímeros (por ejemplo dímeros o trímeros) de estas cadenas, en donde estas cadenas están opcionalmente unidas al disulfuro o por el contrario reticuladas. Estos anticuerpos pueden ser capaces de unirse a uno o más antígenos.

30 En ciertas realizaciones, la presente invención incluye fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos completos, tales como los fragmentos de anticuerpos Fab, F(ab)₂, Fab', F(ab')₂, F(ab')₃, F(v), Fd, dAb, diacuerpo, minicuerpo, y nanocuerpo. La presente invención también se refiere a fragmentos que comprenden solamente un dominio variable individual, tal como un dominio V_H o V_L, o a un fragmento que comprende solamente el dominio de cadena ligera o de cadena pesada. Los fragmentos pueden ser humanizados o completamente humanos. La presente invención también incluye fragmentos de unión a antígeno que se forman de andamios alternativos (véase, por ejemplo, Binz y Hosse anteriormente) o que comprenden un armazón universal. La presente invención también se refiere a conjugados que comprenden cualquier fragmento de unión a antígeno o proteína de unión a CD154 que se une específicamente a CD154 conjugado covalente o no covalentemente, o directa o indirectamente, a una fracción funcional tal como una proteína vehículo o PEG, por ejemplo.

35 Los anticuerpos anti-CD154 de la presente invención incluyen anticuerpos divalentes. De esta forma, en ciertas realizaciones, la invención se refiere a un fragmento de anticuerpo anti-CD154 divalente que comprende dos cadenas pesadas de anticuerpo y al menos una molécula de polímero en un enlace covalente, cada cadena pesada estando covalentemente enlazada a la otra por al menos un puente intercatenario distinto de disulfuro que une el átomo de azufre de un resto de cisteína en una cadena al átomo de azufre de un resto de cisteína en otra cadena, estando localizados los restos de cisteína en la parte exterior del dominio de la región variable de cada cadena, caracterizado por que al menos un puente intercatenario distinto de disulfuro contiene una molécula de polímero covalentemente enlazada. La frase "distinto de disulfuro" como se utiliza en el presente documento pretende indicar que los puentes S-S, por ejemplo, el tipo normalmente encontrado en los anticuerpos, se excluyen. Un puente intercatenario del tipo presente en un fragmento de acuerdo con la invención puede sin embargo estar igualmente enlazado a una cadena pesada a través de un enlace S-S como se describe a continuación. En general, cada molécula de polímero en el fragmento de anticuerpos divalente de acuerdo con la invención forma parte de un puente intercatenario. Cada puente sirve para enlazar dos cadenas pesadas y cada cadena estará covalentemente enlazada a un átomo de azufre de un resto de cisteína. El enlace covalente generalmente será un enlace de disulfuro o, en realizaciones particulares, un enlace de azufre-carbono. Para estructuras de anticuerpos divalentes ejemplares, véanse los documentos WO 99/64460 y WO 05/061005.

45 La invención también proporciona un anticuerpo anti-CD154 que es un anticuerpo monovalente o fragmento de unión a antígeno monovalente. Como se utiliza en el presente documento, el término "monovalente" significa que un anticuerpo dado o fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, Fv, una cadena individual scFv, dAb, Fab, Fab', Fd, scFab, scFab Δ C, etc.) puede unirse solamente a una sola molécula de su diana. Los anticuerpos de origen natural son generalmente divalentes, ya que tienen dos brazos de unión a antígeno funcionales, cada uno comprendiendo un dominio V_H y V_L. Un anticuerpo divalente puede unir dos moléculas separadas del mismo antígeno en donde la barrera estérica no es un problema. En contraste, un anticuerpo "monovalente" tiene un sitio de unión a antígeno para una

diana. El dominio de unión a antígeno de un anticuerpo monovalente puede comprender un dominio V_H y uno V_L o puede comprender solamente un solo dominio variable de inmunoglobulina, es decir, un dominio V_H o un dominio V_L , que tiene la capacidad de unir CD154 sin la necesidad de dominios V_H y V_L , respectivamente. Un anticuerpo monovalente ilustrativo es un fragmento Fd que comprende un solo dominio variable de inmunoglobulina y que solamente puede unir una molécula de antígeno CD154. Un anticuerpo monovalente carece de la capacidad para entrelazar moléculas de un solo antígeno.

Esta invención proporciona un anticuerpo anti-CD154, en donde el anticuerpo se une específicamente a un epítipo al cual se unen específicamente fragmentos Fab o Fab' humanizados con una secuencia de cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 12 o 13, respectivamente y con una secuencia de cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 15. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de esta divulgación es un fragmento de anticuerpo con una secuencia de cadena pesada o variable de acuerdo con SEQ ID NO: 1, 9, 10 u 11 y con una secuencia de cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 2 o 4. En otras realizaciones, el anticuerpo de esta invención es un fragmento de anticuerpo con una secuencia de cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 12 o 13 y una secuencia de cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 15.

En ciertas realizaciones, la proteína de unión a CD154 o anticuerpo comprende o consiste en una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO: 13. En ciertas realizaciones, la proteína de unión a CD154 o anticuerpo comprende o consiste en una secuencia de cadena ligera SEQ ID NO: 15 y una secuencia de cadena pesada SEQ ID NO: 12.

En realizaciones alternativas, la divulgación proporciona un fragmento de anticuerpo que comprende una secuencia de cadena pesada variable de acuerdo con SEQ ID NO: 56 y que comprende una secuencia de cadena ligera variable de acuerdo con SEQ ID NO: 54. En otras realizaciones, el anticuerpo de esta divulgación es un fragmento de anticuerpo que comprende una secuencia de cadena pesada variable de acuerdo con SEQ ID NO: 60 y que comprende una secuencia de cadena ligera variable de acuerdo con SEQ ID NO: 58.

En una realización, esta invención proporciona un fragmento Fab' o $F(ab')_2$ o $F(ab')_3$ que se une específicamente CD154. Este fragmento Fab' o $F(ab')_2$ o $F(ab')_3$ puede ser humanizado y tener una secuencia de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 13 y puede tener una secuencia de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 15.

En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-CD154 que está libre de un dominio Fc. El anticuerpo o fragmento deficiente de Fc puede ser monovalente, divalente o incluso multivalente.

Esta invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente al epítipo al cual se unen los fragmentos Fab' o $F(ab')_2$ o $F(ab')_3$ descritos anteriormente específicamente. Estos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden identificarse a través de un ensayo de bloqueo cruzado como se describe en el presente documento (Ejemplo 9). Estos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden ser aislados, recombinantes o sintéticos y pueden unirse a una segunda molécula para formar un conjugado de anticuerpo.

Anticuerpos con función efectora reducida

La interacción de los anticuerpos y los complejos de anticuerpos-antígeno con células del sistema inmune desencadenan una diversidad de respuestas, denominadas en el presente documento funciones efectoras. Los anticuerpos IgG activan las rutas efectoras del sistema inmune mediante la unión a membranas de la familia de los receptores Fc γ de la superficie celular y a C1q del sistema complementario. La ligación de las proteínas efectoras a través de anticuerpos agrupados desencadena una diversidad de respuestas, incluyendo la liberación de las citocinas inflamatorias, la regulación de la producción de antígenos, la endocitosis, y la muerte celular. En algunas aplicaciones clínicas estas respuestas son cruciales para la efectividad de un anticuerpo monoclonal. En otras provocan efectos secundarios indeseados tales como inflamación y la eliminación de las células que llevan el antígeno. Por consiguiente, la presente invención además se refiere a anticuerpos anti- CD154, con funciones alteradas, por ejemplo, funciones efectoras, reducidas. De manera importante, la función efectora reducida no necesariamente reduce la capacidad de un anticuerpo anti-CD154 para inhibir una o varias enfermedades a través del bloqueo de la interacción CD154-CD40 (véase el documento WO 05/03175, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad).

Los anticuerpos anti-CD154 con una función efectora disminuida (por ejemplo, funciones efectoras mediadas por Fc; véase a continuación) son particularmente deseables para utilizarse en sujetos en donde existe el potencial de actividad tromboembólica indeseable. Adicionalmente, la función efectora disminuida de los anticuerpos anti-CD154 puede disminuir o eliminar otros efectos secundarios indeseados potenciales de las terapias de anticuerpo anti-CD154 tales como eliminación de células T activadas u otras poblaciones de células inducidas para expresar CD154 o activación dependiente de Fc de monocitos/macrófagos.

La función efectora de un anticuerpo anti-CD154 de la presente invención puede determinarse utilizando uno de muchos ensayos conocidos. La función efectora del anticuerpo anti-CD154 puede reducirse con relación a un segundo anticuerpo anti-CD154. En algunas realizaciones, el segundo anticuerpo anti-CD154 puede ser cualquier anticuerpo

que une CD154 específicamente. En algunas realizaciones, el segundo anticuerpo anti-CD154 puede ser un anticuerpo 5c8 (producido por el hibridoma depositado con ATCC bajo el N.º de Acceso HB 10916, como se describe en el documento US 5.474.771) o 5c8 humanizado. En otras realizaciones, el segundo anticuerpo específico de CD154 puede ser cualquiera de los anticuerpos de la invención tales como 342, 381, 338, 294, 295, 300, 335, 303 o 402 (Figura 12). En otras realizaciones, en donde el anticuerpo anti-CD154 de interés ha sido modificado para reducir la función efectora, el segundo anticuerpo anti-CD154 puede ser la versión no modificada parental del anticuerpo.

La función efectora de un anticuerpo anti-CD154 de la presente invención puede también determinarse, por ejemplo, midiendo el nivel de agregación de plaquetas o la activación causada por el tratamiento con el anticuerpo anti-CD154 con relación a un anticuerpo de control. En algunas realizaciones, por consiguiente, los anticuerpos anti-CD154 de la presente invención no median o no mejoran la agregación de las plaquetas o la activación en un ensayo de agregación o activación de plaquetas estándar. En otras realizaciones, los anticuerpos anti-CD154 median un nivel inferior de agregación de plaquetas o activación con relación a un segundo anticuerpo anti-CD154 (Véase, por ejemplo, 5c8 o 5c8 humanizado).

Las funciones efectoras ejemplares incluyen la unión del receptor Fc, fagocitosis, apoptosis, respuestas pro-inflamatorias, regulación descendente de los receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de la célula B; BCR), etc. Otras funciones efectoras incluyen citotoxicidad mediada por célula dependiente del anticuerpo (ADCC), en donde los anticuerpos unen los receptores Fc en células T citotóxicas, linfocitos citolíticos naturales (NK), o los macrófagos conducen a la muerte celular, y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), que es una muerte celular inducida a través de la activación de la cascada de complemento (revisado en Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997); Ward y Ghetie, *Therapeutic Immunol.* 2:77-94 (1995); y Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)). Las funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable del anticuerpo) y puede evaluarse utilizando ensayos convencionales que se conocen en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos WO 05/018572, WO 05/003175, y U.S. 6.242.195).

Las funciones efectoras pueden evitarse mediante el uso de fragmentos de anticuerpo que carecen del dominio Fc tal como Fab, Fab'2, o de cadena individual Fv. Una alternativa ha sido el uso del anticuerpo del subtipo IgG4, que une a FcγRI pero que une pobremente a C1q y FcγRII y RIII. El subtipo IgG2 también tiene una unión reducida a los receptores Fc, pero retiene una unión significativa al alotipo H131 de FcγRIIIa y a C1q. De esta forma, los cambios adicionales en la secuencia Fc se requieren para eliminar la unión de todos los receptores Fc y C1q.

Varias funciones efectoras del anticuerpo, incluyendo ADCC, están mediadas por los receptores FC (FcR), que unen la región Fc de un anticuerpo. La afinidad de un anticuerpo para un FcR particular, y por lo tanto la actividad efectora mediada por el anticuerpo, pueden modularse alterando la secuencia de aminoácido y/o modificaciones post-traducción de la región Fc y/o constante del anticuerpo.

Los FcR se definen por su especificidad para isotipos de inmunoglobulina; los receptores Fc para anticuerpos IgG se denominan FcγR, para IgE FcεR, para IgA FcαR, etcétera. Se han identificado tres clases de FcγR: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16). Tanto FcγRII como FcγRIII tienen dos tipos: FcγRIIA (CD32) y FcγRIIB (CD32); y FcγRIIIA (CD16a) y FcγRIIIB (CD16b). Debido a que cada subclase FcγR se codifica por dos o tres genes, y la división de ARN alternativa conduce a múltiples transcripciones, existe una amplia diversidad en isoformas FcγR. Por ejemplo, FcγRII (CD32) incluye las isoformas IIa, IIb1, IIb2 IIb3, y IIc.

El sitio de unión en los anticuerpos humano y murino para FcγR se ha mapeado previamente a la denominada "región bisagra inferior" que consiste en los restos 233-239 (enumeración de índice de EU como en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a. Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), Woof *et al.*, *Molec. Immunol.* 23:319-330 (1986); Duncan *et al.*, *Nature* 332:563 (1988); Canfield y Morrison, *J. Exp. Med.* 173:1483-1491 (1991); Chappel *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88:9036-9040 (1991)). De los restos 233-239, P238 y S239 están entre los citados como posiblemente estando implicados en la unión. Otras áreas previamente citadas posiblemente implicadas en la unión FcγR son: G316-K338 (IgG humano) para FcγRI humano (a través de la comparación de secuencia solamente; no se evaluaron mutantes en sustitución) (Woof *et al.*, *Molec Immunol.* 23:319-330 (1986)); K274-R301 (IgG humano) para FcγRIII humano (con base en el péptido) (Sarmay *et al.*, *Molec. Immunol.* 21:43-51 (1984)); y Y407-R416 (IgG humano) para FcγRIII humano (con base en el péptido) (Gergely *et al.*, *Biochem. Soc. Trans.* 12:739-743 (1984) y Shields *et al.*, *J Biol Chem* 276: 6591-6604 (2001), Lazar GA *et al.*, *Proc Natl Acad Sci* 103: 4005-4010 (2006)). Estos y otros alargamientos o regiones de los restos de aminoácidos implicados en la unión FcR pueden ser evidentes para el experto en la materia a partir de un examen de las estructuras cristalinas de los complejos Ig-FcR (Véase, por ejemplo, Sondermann *et al.*, 2000 *Nature* 406(6793):267-73 y Sondermann *et al.*, 2002 *Biochem Soc Trans.* 30(4):481-6). Por consiguiente, los anticuerpos anti-CD154 de la presente invención incluyen modificaciones de uno o más de los restos antes mencionados.

Otros enfoques conocidos para reducir la función efectora mAb incluyen mutación de aminoácidos en la superficie de mAb que están implicados en la interacción de unión efectoras Lund, J., *et al.*, (1991) *J. Immunol.* 147(8): 2657-62; Shields, R. L. *et al.*, (2001) *J. Biol. Chem.* 276(9): 6591-604; y el uso de combinaciones de diferentes subtipos de segmentos de secuencia (por ejemplo, IgG2 y combinaciones de IgG4) para dar una mayor reducción en la unión a los receptores Fcγ que cualquiera de los subtipos por sí solos (Armour *et al.*, *Eur. J. Immunol.* (1999) 29: 2613-1624;

Mol. Immunol. 40 (2003) 585-593).

Un gran número de variantes Fc que tienen afinidades alteradas y/o reducidas para algunos o todos los subtipos Fc (y de esta forma para las funciones efectoras) se conocen en la técnica, véanse, por ejemplo, los documentos US 2007/0224188; US 2007/0148171; US 2007/0048300; US 2007/0041966; US 2007/0009523; US 2007/0036799; US 2006/0275283; US 2006/0235208; US 2006/0193856; US 2006/0160996; US 2006/0134105; US 2006/0024298; US 2005/0244403; US 2005/0233382; US 2005/0215768; US 2005/0118174; US 2005/0054832; US 2004/0228856; US 2004/132101; US 2003/158389; véanse también los documentos US 7.183.387; 6.737.056; 6.538.124; 6.528.624; 6.194.551; 5.624.821; 5.648.260.

En CDC, el complejo anticuerpo-antígeno une el complemento, dando como resultado la activación de la cascada complemento y la generación del complejo de ataque de membrana. La activación de la trayectoria de complemento clásica se inicia por la unión del primer componente del sistema complemento (C1q) a los anticuerpos (de la subclase apropiada) que se unen a su antígeno afín. De esta forma la activación de la cascada del complemento se regula en parte por la afinidad de unión de la inmunoglobulina a la proteína C1q. Para activar la cascada de complemento, es necesario que C1q se una a al menos dos moléculas de IgG1, IgG2, o IgG3, pero solamente una molécula de IgM, unida a la diana antigénica (Ward y Ghetie, *Therapeutic Immunology* 2:77-94 (1995) p. 80). Para evaluar la activación del complemento, puede llevarse a cabo un ensayo CDC, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

Se ha propuesto que diversos restos de la molécula IgG estén implicados en la unión a C1q incluyendo los restos en el dominio CH2, el resto de aminoácido 331 localizado en una vuelta en proximidad contigua a la misma cepa beta, el resto Lys235 y Gly237 localizado en la región de conexión inferior, y los restos 231 a 238 localizados en la región N-terminal del dominio CH2 (véase, por ejemplo, Xu *et al.*, *J. Immunol.* 150:152A (Abstract) (1993), WO94/29351; Tao *et al.*, *J. Exp. Med.*, 178:661-667 (1993); Brekke *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 24:2542-47 (1994); Burton *et al.*; *Nature*, 288:338-344 (1980); Duncan y Winter, *Nature* 332:738-40 (1988); Idusogie *et al.*, *Immunol* 164:4178-4184 (2000; U.S. 5.648.260, y U.S. 5.624.821). Como un ejemplo en IgG1, dos mutaciones en la región terminal COOH del dominio CH2 de IgG1 humano, K322A y P329A no activa la trayectoria CDC y mostraron que dan como resultado una disminución de más de 100 veces en la unión C1q (US 6.242.195).

De esta forma, en ciertas realizaciones de la invención, uno o más de estos restos pueden modificarse, sustituirse o retirarse o uno más restos de aminoácido pueden insertarse para así disminuir la actividad de CDC de los anticuerpos CD154 provistos en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, puede ser deseable reducir o eliminar la función o funciones efectoras de los anticuerpos objeto con el fin de reducir o eliminar el potencial de respuestas inmunes activadas adicionalmente. Los anticuerpos con una función efectora disminuida también pueden reducir el riesgo de eventos tromboembólicos en sujetos que reciben los anticuerpos.

En ciertas otras realizaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD154 que exhibe una unión reducida a uno o más receptores FcR pero que mantiene su capacidad de unir el complemento (por ejemplo, a un anticuerpo anti-CD154 similar o en algunas realizaciones, en un grado menor a un anticuerpo anti-CD154 nativo, no variante, o parental). Por consiguiente un anticuerpo anti-CD154 de la presente invención puede unir y activar el complemento mientras se exhibe una unión reducida a un FcR, tal como, por ejemplo, FcγRIIIa (por ejemplo, FcγRIIIa expresaron plaquetas). El anticuerpo con una unión reducida o sin unión a FcγRIIIa (tal como FcγRIIIa expresaron plaquetas, por ejemplo) pero que puede unir C1q y activar la cascada de complemento hasta al menos cierto grado reducirá el riesgo el eventos tromboembólicos mientras mantiene quizás las funciones efectoras deseables. En realizaciones alternativas, un anticuerpo anti-CD154 de la presente invención exhibe una unión reducida a uno o más FcR pero mantiene su capacidad de unir uno o más de otros FcR diferentes. Véase, por ejemplo, US 2007-0009523, 2006-0194290, 2005-0233382, 2004-0228856, y 2004-0191244, que describen diversas modificaciones de aminoácidos que generan anticuerpos con unión reducida a FcRI, FcRII, y/o FcRIII, así como sustituciones de aminoácidos que dan como resultado una unión aumentada a un FcR pero unión disminuida a otro FcR.

Por consiguiente, las funciones efectoras que implican a la región constante de un anticuerpo anti-CD154 pueden modularse alterando las propiedades de la región constante, y la región Fc en particular. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD154 que tiene una función efectora reducida se compara con un segundo anticuerpo con una función efectora y que puede ser un anticuerpo no variante, nativo o parental (por ejemplo, el anticuerpo 342 o el anticuerpo 5c8, que se describe en el documento US 5.474. 771) que comprende una región constante nativa o Fc que media la función efectora. En realizaciones particulares, la modulación de la función efectora incluye situaciones en donde se abole una actividad o está completamente ausente.

Una secuencia nativa Fc o región constante comprende una secuencia de aminoácido idéntica a la secuencia de aminoácido de una región Fc o de cadena constante encontrada en la naturaleza. Preferentemente, una molécula de control utilizada para evaluar la función efectora relativa comprende el mismo tipo/subtipo de la región Fc como lo hace un anticuerpo de prueba o variante. Una variante o Fc alterada o región constante comprende una secuencia de aminoácido que difiere de una región de cadena pesada de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácido (por ejemplo, una modificación post-traducciona, sustitución, inserción o eliminación de aminoácido). Por consiguiente, la región constante y variante puede contener una o más sustituciones, eliminación o inserciones de

aminoácido que dan como resultado modificaciones post-traduccionales alteradas incluyendo, por ejemplo, un patrón de glucosilación alterado. Un anticuerpo parental o región Fc es, por ejemplo, una variante que tiene una función efectora normal utilizada para construir una región constante (es decir, Fc) que tiene una función efectora alterada, por ejemplo, reducida.

Los anticuerpos con función o funciones efectoras alteradas (por ejemplo, reducidas o eliminadas) pueden generarse modificando o produciendo anticuerpos con una constante variante, una región Fc, o de cadena pesada. La tecnología de ADN recombinante y/o el cultivo celular y las condiciones de expresión pueden utilizarse para producir anticuerpos con una función y/o actividad alterada. Por ejemplo, la tecnología de ADN recombinante puede utilizarse para modificar una o más sustituciones, eliminaciones o inserciones del aminoácido en regiones (tales como por ejemplo, las regiones Fc o constantes) que afectan la función del anticuerpo incluyendo las funciones efectoras. Alternativamente, los cambios en las modificaciones post-traduccionales, tales como los patrones de glucosilación (véase a continuación) puede lograrse mediante la manipulación de la célula hospedadora y del cultivo celular y las condiciones de expresión a través de las cuales se produce el anticuerpo.

Las alteraciones de aminoácido tales como las sustituciones de aminoácidos, pueden alterar la función efectora de los anticuerpos anti-CD154 de la presente invención sin afectar a la afinidad de unión del antígeno. Las sustituciones de aminoácido descritas anteriormente (por ejemplo, Glu318, Kys320, Lys332, Lys235, Gly237, K332, y P329) pueden utilizarse para generar anticuerpos con una función efectora reducida.

En otras realizaciones, las sustituciones de aminoácido pueden hacerse para uno o más de los siguientes restos de aminoácido: 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320, y 322 de la región constante de cadena pesada (véanse los documentos US 5.624.821 y US 5.648.260). Dichas sustituciones pueden alterar la función efectora mientras retienen la actividad de unión a antígeno. Una alteración en uno o más de los aminoácidos 234, 235, 236, y 237 puede disminuir la afinidad de unión a la región Fc del receptor FcγRI en comparación con un anticuerpo no modificado o no variante. Los restos de aminoácido 234, 236, y/o 237 pueden sustituirse con alanina, por ejemplo, y el resto de aminoácido 235 puede sustituirse con glutamina, por ejemplo. En otra realización, un anticuerpo IgG1 anti-CD154 puede comprender una sustitución de Leu en la posición 234 con Ala, una sustitución de Leu en la posición 235 con Glu, y una sustitución de Gly en la posición 237 con Ala.

Adicional o alternativamente, los restos de aminoácido Fc en 318, 320 y 322 pueden alterarse. Estos restos de aminoácidos, mientras están altamente conservados en IgG de ratón y humano, median la unión del complemento. Se ha demostrado que la alteración de estos restos de aminoácido reduce la unión C1q pero no altera la unión del antígeno, la unión de la proteína A, o la capacidad de Fc para unir los macrófagos de ratón.

En otra realización, un anticuerpo anti-CD154 de la presente invención es una inmunoglobulina IgG4 que comprende sustituciones que reducen o eliminan la función efectora. La porción Fc de IgG4 de un anticuerpo anti-CD154 de la invención puede comprender una o más de las siguientes sustituciones: sustitución de prolina por glutamato en el resto 233, alanina o valina por fenilalanina en el resto 234 y alanina o glutamato por leucina en el resto 235 (enumeración EU Kabat, E. A. *et al.*, (1991), *supra*). Además, la retirada del sitio de glucosilación enlazado a N en la región Fc IgG4 al sustituir Ala por Asn en el resto 297 (enumeración EU) además puede reducir la función efectora y eliminar cualquier actividad efectora residual que pueda existir. Otra IgG4 mutante ejemplar con una función efectora reducida es la variante del subtipo IgG4 que contiene las mutaciones S228P y L235E (mutación PE) en la región constante de la cadena pesada. Esta mutación da como resultado una función efectora reducida. Véanse los documentos US 5.624.821 y US 5.648.260. Otra mutación ejemplar en el contexto IgG4 que reduce la función efectora es S228P/T229A, como se describe en el presente documento.

Otros cambios en la secuencia de aminoácido ejemplares en la región constante incluyen pero no se limitan a la mutación Ala-Ala descrita por Bluestone *et al.*, (véanse los documentos WO 94/28027 y WO 98/47531; también véase Xu *et al.*, 2000 Cell Immunol 200; 16-26). De esta forma en ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-CD154 con mutaciones dentro de la región constante incluyendo la mutación Ala-Ala pueden utilizarse para reducir o abolir la función efectora. De acuerdo con estas realizaciones, la región constante de un anticuerpo anti-CD154 comprende una mutación en una alanina en la porción 234 o una mutación en la alanina en la posición 235. Adicionalmente, la región constante puede contener una mutación doble: una mutación a una alanina en la posición 234 y una segunda mutación a una alanina en la posición 235.

En una realización, un anticuerpo anti-CD154 comprende un marco IgG4, en donde la mutación Ala-Ala describiría una mutación o mutaciones de fenilalanina a alanina en la posición 234 y/o una mutación de leucina a alanina en la posición 235. En otra realización, el anticuerpo anti-CD154 comprende un marco IgG1, en donde la mutación Ala-Ala describiría una mutación o mutaciones de leucina a alanina en la posición 234 y/o una mutación de leucina a alanina en la posición 235. Un anticuerpo anti-CD154 puede llevar otras mutaciones alternativa o adicionalmente, incluyendo la mutación puntual K322A en el dominio CH2 (Hezareh *et al.*, 2001 J Virol. 75: 12161-8).

Otras sustituciones de aminoácido ejemplares se proveen en el documento WO 94/29351 (que se incorpora aquí por referencia en su totalidad), que recita anticuerpos que tienen mutaciones en la región N-terminal del dominio CH2 para alterar la capacidad de los anticuerpos para unirse a FcRI, por lo tanto disminuyendo la capacidad de los anticuerpos

para unirse a C1q, que a su vez disminuye la capacidad de los anticuerpos para fijar el complemento. También véase Cole *et al.* (J. Immunol. (1997) 159: 3613-3621), que describe mutaciones en la región CH2 superior en IgG2 que da como resultado una unión FcR.

5 Los métodos para generar cualquiera de las variantes de anticuerpos anteriormente mencionadas que comprenden sustituciones de aminoácido son bien conocidas en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, preparación a través de mutagénesis dirigida al sitio (o mediada por oligonucleótido), mutagénesis por PCR, y mutagénesis de casete de una molécula de ADN preparada que codifica el anticuerpo o al menos una región constante del anticuerpo.

10 La mutagénesis dirigida al sitio es bien conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Carter *et al.*, Nucleic Acids Res. 13:4431-4443 (1985) y Kunkel *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488 (1987)).

15 La mutagénesis por PCR también es adecuada para crear variantes de las secuencias de aminoácido del polipéptido de partida. Véase, Higuchi, en PCR Protocols, pp.177- 183 (Academic Press, 1990); y Vallette *et al.*, Nuc. Acids Res. 17:723-733 (1989).

Otro método para preparar variantes de secuencia, mutagénesis de casete, se basa en la técnica descrita por Wells *et al.*, Gene 34:315-323 (1985).

20 Otra realización de la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-CD154 con una función efectora reducida en donde la región Fc del anticuerpo, o las porciones de la misma, se alternan con una región Fc (o con porciones de la misma) que tienen una función efectora naturalmente reducida que induce la actividad. Por ejemplo, la región constante IgG4 humana exhibe activación reducida o nada del complemento. Además, las diferentes moléculas IgG difieren en su afinidad de unión a FcR, que puede deberse al menos en parte a la longitud variable y flexibilidad a las regiones de conexión de IgG (que disminuyen el orden de IgG3>IgG1>IgG4>IgG2). Por ejemplo, IgG4 exhibe una unión reducida o una unión a FcγRIIa. Para ejemplos de moléculas quiméricas y regiones constantes quiméricas, Véase, por ejemplo Gillies *et al.*, (Cancer Res. 1999, 59: 2159-2166) y Mueller *et al.*, (Mol. Immunol. 1997, 34: 441-452).

30 La invención también se refiere a anticuerpos anti-CD154 con función efectora reducida en donde la región Fc está completamente ausente. Dichos anticuerpos también pueden referirse a derivados de anticuerpo y fragmentos de unión a antígeno de la presente invención. Los derivados y fragmentos pueden fusionarse a secuencias de proteína no de anticuerpos o estructuras no de proteína, especialmente estructuras diseñadas para facilitar la distribución y/o biodisponibilidad cuando se administran a un animal, por ejemplo, un sujeto humano (véase a continuación).

35 Como se explicó anteriormente, los cambios dentro de la región de conexión también afectan las funciones efectoras. Por ejemplo, la eliminación de la región de conexión puede reducir la afinidad para receptores Fc y puede reducir la activación del complemento (Klein *et al.*, 1981 PNAS USA 78: 524-528). La presente descripción por consiguiente también se refiere a anticuerpos con alteraciones en la región bisagra.

40 En realizaciones particulares, los anticuerpos de la presente invención pueden modificarse para inhibir la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). La actividad CDC modulada puede lograrse introduciendo una o más sustituciones, inserciones o eliminaciones de aminoácido en la región Fc del anticuerpo (véase, por ejemplo, US 6.194.551 y US 6.242.195). Alternativa o adicionalmente, el resto o restos de cisteína pueden introducirse en la región Fc, permitiendo por lo tanto la formación del enlace de disulfuro intercatenario en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de esta forma puede tener una capacidad de internalización mejorada o reducida y/o muerte celular mediada por el complemento aumentada o disminuida. Véase Caron *et al.*, J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992), el documento WO 99/51642, Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988); US 5.648.260; US 5.624.821; y WO 94/29351.

45 Además se entiende que la función efectora puede variar de acuerdo con la afinidad de unión del anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos con alta afinidad pueden ser más eficientes en la activación del sistema del complemento en comparación con anticuerpos con una afinidad relativamente baja (Marzocchi-Machado *et al.*, 1999 Immunol Invest 28: 89- 101). Por consiguiente, un anticuerpo debe alterarse de tal forma que la afinidad de unión a su antígeno se reduce (por ejemplo, cambiando las regiones variables del anticuerpo a través de métodos tales como sustitución, adición o eliminación de uno o más restos de aminoácido). Un anticuerpo con afinidad de unión reducida puede exhibir funciones efectoras reducidas, incluye, por ejemplo, ADCC y/o CDC reducido.

60 Los anticuerpos anti-CD154 de la presente invención con función efectora reducida incluyen anticuerpos con la afinidad de unión reducida para uno o más receptores Fc (FcR) con relación a un anticuerpo anti-CD154 parental o no variante. Por consiguiente, los anticuerpos anti-CD154 con afinidad de unión FcR reducida incluyen anticuerpos anti-CD154 que exhiben una disminución de 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 4 veces o 5 veces o mayor en la afinidad de unión a uno o más receptores Fc en comparación con un anticuerpo anti-CD154 parental o no variante (por ejemplo, anticuerpo 342 o 5c8). En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD154 con una función efectora reducida se une a un FcR con aproximadamente 10 veces menos afinidad con relación a un anticuerpo parental o no

65

variante. En otras realizaciones, un anticuerpo anti-CD154 con una función efectora reducida se une a un FcR con aproximadamente 15 veces menos de afinidad o con aproximadamente 20 veces menos de afinidad con relación a un anticuerpo parental o no variante. El receptor FcR puede ser uno o más de FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), y FcγRIII, y sus isoformas, y FcεR, FcμR, FcδR, y/o un FcαR. En realizaciones particulares un anticuerpo anti-CD154 con función efectora reducida exhibe una disminución de 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 4 veces, o 5 veces o mayor en la afinidad de unión a FcγRIIIa.

Por consiguiente, en ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-CD154 de la presente invención exhibe una unión reducida a una proteína complemento con relación a un segundo anticuerpo anti-CD154. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD154 de la invención exhibe una unión reducida por un factor de aproximadamente 1,5 veces o más, aproximadamente 2 veces o más, aproximadamente 3 veces o más, aproximadamente 4 veces o más, aproximadamente 5 veces o más, aproximadamente 6 veces o más, aproximadamente 7 veces o más, aproximadamente 8 veces o más, aproximadamente 9 veces o más, aproximadamente 10 veces o más, o aproximadamente 15 veces o más, con relación a un segundo anticuerpo anti-CD154.

Por consiguiente, en ciertas realizaciones la presente invención se refiere a anticuerpos que provocan una función efectora reducida cuando se administra a un sujeto. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-CD154 de esta invención no causa la trombosis en un sujeto al cual se administra el anticuerpo. La trombosis incluye, por ejemplo, eventos tromboembólicos. Los eventos incluyen, por ejemplo, vasculopatía (por ejemplo, cambios vasculares tales como engrosamiento de la íntima y cambios en la pared del vaso). En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD154 de esta invención causa menos efectos tromboembólicos con relación a un segundo anticuerpo específico CD154 (por ejemplo, anticuerpo 342, el anticuerpo 5c8 o 5c8 humanizado). Un anticuerpo anti-CD154 con una función efectora reducida puede demostrar una reducción de 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, o 50 % en el número de eventos tromboembólicos cuando se administra a un sujeto y en comparación con un anticuerpo anti-CD154 no variante o parental.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-CD154 de esta invención no causa agregación de plaquetas o activación *in vitro* y/o mejora la agregación o activación de plaquetas a un grado menor cuando se compara con un segundo anticuerpo específico de CD154 (por ejemplo, anticuerpo 5c8 o 5c8 humanizado; véase el Ejemplo 1). Por consiguiente, en ciertas realizaciones la presencia de la proteína de unión a CD154, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD154, de la presente invención en un ensayo de agregación o activación de plaquetas convencional no da como resultado la agregación o activación de más de 20 %, 25 %, 30 % o 50 % sobre la agregación o activación observada en un ensayo de control negativo. Un ensayo de agregación de plaquetas convencional ejemplar es el ensayo descrito en el presente documento (Ejemplo 11, Ensayo 1) y mostrado en la Figura 26. Ambos ensayos convencionales y un ensayo de agregación de plaquetas alternativo (Ensayo 2, Figura 27) que pueden utilizarse en la invención se describen en el Ejemplo 11. La proteína de unión a CD154 puede ser soluble.

En ciertas realizaciones, esta invención también proporciona un anticuerpo anti-CD154 que comprende un solo dominio variable de inmunoglobulina que se une específica y monovalentemente a CD40L, en donde la unión de dicha proteína soluble a CD154 sustancialmente no induce a la fosforilación JNK en células T de Jurkat. Esta invención también proporciona proteína de unión a CD154, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD154, y la proteína comprende un solo dominio variable de inmunoglobulina que se une específica y monovalentemente a CD154, en donde la unión de la proteína soluble a CD154 no induce sustancialmente la secreción de IFN-gama a través de las células T Jurkat co-estimuladas con el anticuerpo Anti-CD3.

Ciertas realizaciones de la presente divulgación también se refieren a un anticuerpo anti-CD154 que comprende una o más secuencias CDR de cadena pesada seleccionadas de DR- H1 (SEQ ID NO: 3), CDR-H2 (SEQ ID NO: 4) y CDR-H3 (SEQ ID NO: 5), en donde el anticuerpo además comprende una región Fc variante que confiere una función efectora reducida comparada con una región Fc nativa o parental. En realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-CD154 comprende al menos dos de las CDR, y en otras realizaciones el anticuerpo comprende las tres secuencias CDR de cadena pesada, que son CDR-H1 (SEQ ID NO: 3), CDR-H2 (SEQ ID NO: 4) y CDR-H3 (SEQ ID NO: 5).

Otras realizaciones de la presente divulgación se refieren a un anticuerpo anti-CD154 que comprende una o más secuencias CDR de cadena ligera seleccionadas de CDR- L1 (SEQ ID NO: 6), CDR-L2 (SEQ ID NO: 7) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 8), comprendiendo el anticuerpo además una región Fc variante que confiere una función efectora reducida comparada con una región Fc nativa o parental. En realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-CD154 comprende al menos dos de las CDR de cadena ligera, en otras realizaciones el anticuerpo comprende las tres secuencias CDR de cadena ligera, que son CDR-L1 (SEQ ID NO: 6), CDR-L2 (SEQ ID NO: 7) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 8).

En realizaciones adicionales de la presente divulgación, el anticuerpo anti-CD154 con función efectora reducida comprende las tres secuencias CDR de cadena ligera, que son CDR-L1 (SEQ ID NO: 6), CDR-L2 (SEQ ID NO: 7) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 8), y comprende las tres secuencias CDR de cadena pesada, que son CDR-H1 (SEQ ID NO: 3), CDR-H2 (SEQ ID NO: 4) y CDR-H3 (SEQ ID NO: 5).

En ciertas realizaciones, esta divulgación proporciona un anticuerpo anti-CD154 que se une específicamente a una

- 5 proteína CD154, en donde el anticuerpo comprende una secuencia V_H seleccionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11. En otras ciertas realizaciones, esta divulgación proporciona el anticuerpo que se une específicamente a una proteína CD154, en donde el anticuerpo comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada de SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13. En realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-CD154 que comprende una cualquiera de una o más de las CDR o secuencias de cadena ligera o pesada descritas anteriormente es un fragmento Fab o Fab' o uno de sus derivados. En aún otras realizaciones, el anticuerpo es un fragmento $F(ab')_2$ o uno de sus derivados. También se incluyen otros fragmentos de anticuerpo derivados de los mismos que comprenden la CDR o las secuencias de cadena pesada o ligera que unen específicamente una proteína CD154. Estos anticuerpos pueden modificarse para así provocar funciones reducidas o no efectoras. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-CD154 que comprende una secuencia V_H seleccionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11, el anticuerpo además comprende la región Fc variante que confiere una función efectora reducida comparada con una región Fc nativa parental.
- 10 En otras realizaciones, la divulgación se refiere a un anticuerpo anti-CD154 que comprende una secuencia V_L seleccionada de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 14, el anticuerpo además comprende una región Fc variante que confiere una función efectora reducida comparada con una región Fc nativa o parental.
- 15 En algunas realizaciones, un anticuerpo comprende una secuencia de cadena ligera variable de SEQ ID NO: 2. En realizaciones adicionales, un anticuerpo comprende SEQ ID NO: 2 que es un fragmento Fab o Fab' o un derivado de los mismos. En aún otras realizaciones, el anticuerpo es un fragmento $F(ab')_2$ o uno de sus derivados. También se incluyen otros fragmentos de anticuerpo o sus derivados comprenden las CDR o las secuencias de cadena pesada o ligera que se unen específicamente a una proteína CD154.
- 20 En realizaciones adicionales, la divulgación se refiere a un anticuerpo anti-CD154 que comprende una secuencia V_L seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 14 y además comprende una secuencia V_H seleccionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11, el anticuerpo además comprende una región Fc variante que confiere una función efectora reducida comparada con una región Fc nativa o parental.
- 25 En otras realizaciones, la divulgación se refiere a un anticuerpo anti-CD154 que comprende una secuencia V_H de SEQ ID NO: 29 y una secuencia V_L de SEQ ID NO: 30, el anticuerpo además comprende una región Fc variante que confiere una función efectora reducida comparada con una región Fc nativa o parental.
- 30 En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-CD154 que se une específicamente a una proteína CD154, en donde el anticuerpo comprende una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 15. En realizaciones adicionales, el anticuerpo comprende la secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 15 que además comprende una región Fc variante que confiere una función efectora reducida comparada con una región Fc nativa o parental (por ejemplo, una región Fc con glucosilación alterada y/u otra modificación).
- 35 En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-CD154 que comprende una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13, el anticuerpo además comprende una región Fc variante que confiere una función efectora reducida compara con una región Fc nativa o parental (por ejemplo, una región Fc con glucosilación alterada y/u otra modificación).
- 40 En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-CD154 que comprende una secuencia de cadena ligera como se establece en SEQ ID NO: 2 o 14 y una secuencia de cadena pesada como se establece en SEQ ID NO: 1, 9, 10 u 11. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD154 puede ser un fragmento de anticuerpo. En realizaciones adicionales, el anticuerpo es un fragmento Fab o Fab' o uno de sus derivados. En aún otras realizaciones, el anticuerpo es un fragmento $F(ab')_2$ o uno de sus derivados. Otros fragmentos de anticuerpo o sus derivados comprenden las CDR o las secuencias de cadena pesada y ligera que se unen específicamente a una proteína CD154 también se incluyen. Adicionalmente los anticuerpos pueden exhibir una función efectora reducida. Por ejemplos, los anticuerpos que comprenden una región Fc pueden comprender una región Fc con una o más modificaciones (por ejemplo, glucosilación alterada, conjugación, etc.) de tal forma que el anticuerpo produce una función o funciones efectoras reducidas o ninguna función.
- 45 En otras realizaciones, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-CD154 que comprende una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO: 13, en donde el anticuerpo además comprende una región Fc variante que confiere una región efectora reducida en comparación con una región Fc nativa o parental. En otras realizaciones, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-CD154 que comprende una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO: 12, en donde el anticuerpo además comprende una región Fc variante que confiere una región efectora reducida en comparación con una región Fc nativa o parental.
- 50 En algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-CD154 que comprende una o más secuencias CDR de cadena pesada seleccionadas de CDR-H1 (SEQ ID NO: 42), CDR-H2 (SEQ ID NO: 43) y CDR-H3 (SEQ ID NO: 44), el anticuerpo además comprende una región Fc variante que confiere una función efectora
- 55
- 60
- 65

reducida en comparación con una región Fc nativa o parental. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD154 comprende al menos dos de las CDR de cadena pesada, en otras realizaciones el anticuerpo comprende las tres secuencias CDR de cadena pesada, que son CDR-H1 (SEQ ID NO: 42), CDR-H2 (SEQ ID NO: 43) y CDR-H3 (SEQ ID NO: 44).

5 En ciertas realizaciones, la divulgación se refiere a un anticuerpo anti-CD154 que comprende una o más secuencias CDR de cadena ligera seleccionadas de CDR-L1 (SEQ ID NO: 45), CDR-L2 (SEQ ID NO: 46) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 47), el anticuerpo además comprende una región Fc que confiere una función efectora reducida en comparación con una región Fc nativa o parental. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD154 comprende al menos dos de las
10 CDR de cadena ligera, y en otras realizaciones, el anticuerpo comprende las tres secuencias CDR de cadena ligera, que son CDR-L1 (SEQ ID NO: 45), CDR-L2 (SEQ ID NO: 46) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 47).

15 Realizaciones adicionales de la presente divulgación se refieren al anticuerpo anti-CD154 que comprende una región Fc que confiere una función efectora reducida en comparación con una región Fc nativa o parental, en donde el anticuerpo comprende las tres secuencias CDR de cadena ligera, que son CDR-L1 (SEQ ID NO: 45), CDR-L2 (SEQ ID NO: 46) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 47), y en donde el anticuerpo comprende las tres secuencias CDR de cadena pesada que son CDR-H1 (SEQ ID NO: 42), CDR-H2 (SEQ ID NO: 43) y CDR-H3 (SEQ ID NO: 44).

20 En otras realizaciones, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-CD154 que comprende una o más secuencias CDR de cadena pesada seleccionadas de CDR- H1 (SEQ ID NO: 48), CDR-H2 (SEQ ID NO: 49) y CDR-H3 (SEQ ID NO: 50), el anticuerpo además comprende una región Fc variante que confiere una función efectora reducida en comparación con una región Fc nativa o parental. En realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-CD154 comprende al menos dos CDR de cadena pesada, y en otras realizaciones el anticuerpo comprende las tres
25 secuencias CDR de cadena pesada, que son CDR-H1 (SEQ ID NO: 48), CDR-H2 (SEQ ID NO: 49) y CDR-H3 (SEQ ID NO: 50).

En ciertas realizaciones, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-CD154 que comprende una o más secuencias CDR de cadena ligera seleccionadas de CDR- L1 (SEQ ID NO: 51), CDR-L2 (SEQ ID NO: 52) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 53), el anticuerpo además comprende una Fc variante que confiere una función efectora reducida en comparación con una región Fc nativa o parental. En realizaciones adicionales, el anticuerpo comprende al menos dos de las CDR de cadena ligera, y en otras realizaciones el anticuerpo comprende las tres secuencias CDR de cadena ligera, que son CDR-L1 (SEQ ID NO: 51), CDR-L2 (SEQ ID NO: 52) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 53).

35 En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-CD154 con una función efectora reducida comprende las tres secuencias CDR de cadena ligera, que son CDR-L1 (SEQ ID NO: 51), CDR-L2 (SEQ ID NO: 52) y CDR-L3 (SEQ ID NO: 53), y además comprende las tres secuencias CDR de cadena pesada, que son CDR-H1 (SEQ ID NO: 48), CDR-H2 (SEQ ID NO: 49) y CDR-H3 (SEQ ID NO: 50).

40 En realizaciones adicionales, esta divulgación proporciona un anticuerpo anti-CD154 que se une específicamente a CD154, en donde el anticuerpo comprende una secuencia V_L de SEQ ID NO: 54. La divulgación también se refiere a un anticuerpo anti-CD154 que comprende una secuencia V_H de SEQ ID NO: 56. Un anticuerpo anti-CD154 puede comprender tanto una secuencia V_L de SEQ ID NO: 54 como una secuencia V_H de SEQ ID NO: 56. En realizaciones adicionales, el anticuerpo es un fragmento Fab o Fab' o uno de sus derivados. En aún otras realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es un fragmento $F(ab')_2$ o uno de sus derivados. El anticuerpo también puede ser un
45 anticuerpo humanizado o completamente humano o uno de sus fragmentos. Ciertas realizaciones de la presente invención se refieren al anticuerpo anti-CD154 que comprende una secuencia V_H de SEQ ID NO: 56 y la secuencia V_L de SEQ ID NO: 54, el anticuerpo además comprende una región Fc variante que confiere una función efectora reducida en comparación con una región Fc nativa o parental.

50 En realizaciones adicionales, esta divulgación proporciona un anticuerpo anti-CD154 que se une específicamente a CD154, en donde el anticuerpo comprende una secuencia V_L de SEQ ID NO: 58. En realizaciones adicionales, el anticuerpo comprende una secuencia V_H de SEQ ID NO: 60. En realizaciones adicionales, el anticuerpo o fragmento comprende una secuencia V_H de SEQ ID NO: 60 y una secuencia de V_L de SEQ ID NO: 58. El anticuerpo puede ser un fragmento Fab o Fab' o uno de sus derivados. En otras realizaciones, el anticuerpo es un fragmento $F(ab')_2$ o uno de sus derivados. El anticuerpo también puede ser un anticuerpo humanizado o completamente humano o uno de sus fragmentos. En otras realizaciones, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-CD154 que comprende una secuencia V_H de SEQ ID NO: 58 y una secuencia V_L de SEQ ID NO: 60, el anticuerpo además comprende una región Fc variante que confiere una función efectora reducida en comparación con una región Fc nativa o parental.

60 Anticuerpos anti-CD154 con glucosilación alterada

La retirada del glucano produce un cambio estructural que debería reducir enormemente la unión a todos los miembros de las especies a través de la familia del receptor Fc. En los anticuerpos glucosilados, incluyendo los anticuerpos anti-CD154, los glucanos (oligosacáridos) unidos al sitio N-enlazado conservado en los dominios CH2 del dímero Fc están encasillados entre los dominios CG2, con los restos de azúcar haciendo contacto con los restos de aminoácido específicos en el dominio CH2 opuesto. Los diferentes patrones de glucosilación están asociados con diferentes

propiedades biológicas de los anticuerpos (Jefferis y Lund, 1997, *Chem. Immunol.* 65:111-128; Wright y Morrison, 1997, *Trends Biotechnol.* 15:26-32). Ciertas glucoformas específicas confieren propiedades biológicas potencialmente ventajosas. La pérdida de los glucanos cambia la separación entre los dominios y aumentan su movilidad con relación entre sí y se espera que tengan un efecto inhibitor en la unión de todos los miembros de la familia del receptor Fc. Por ejemplo, los estudios *in Vitro* con varios anticuerpos glucosilados han demostrado que la retirada de los glucanos de CH2 alteran la estructura Fc de tal forma que la unión del anticuerpo y los receptores Fc y la proteína complemento C1q se reduce en gran forma. Otro método conocido para reducir las funciones efectoras es inhibir la producción de o retirar los glucanos N-enlazados en las posiciones 297 (enumeración EU) en el dominio CH2 Fc (Nose *et al.*, 1983 *PNAS* 80: 6632; Leatherbarrow *et al.*, 1985 *Mol. Immunol.* 22: 407; Tao *et al.*, 1989 *J. Immunol.* 143: 2595; Lund *et al.*, 1990 *Mol. Immunol.* 27: 1145; Dorai *et al.*, 1991 *Hybridoma* 10:211; Hand *et al.*, 1992 *Cancer Immunol. Immunother.* 35:165; Leader *et al.*, 1991 *Immunology* 72:481; Pound *et al.*, 1993 *Mol. Immunol.* 30:233; Boyd *et al.*, 1995 *Mol. Immunol.* 32:1311). También se sabe que las diferentes glucoformas pueden afectar profundamente a las propiedades de un terapéutico, incluyendo farmacocinéticas, farmacodinámicas, interacción del receptor y activación específica del tejido (Graddis *et al.*, 2002, *Curr Pharm Biotechnol.* 3: 285-297). En particular, para anticuerpos, la estructura del oligosacárido puede afectar a las propiedades relevantes para la resistencia a proteasa, la vida media en suero del anticuerpo mediado por el receptor, la fagocitosis y la retroalimentación del anticuerpo, además de a las funciones efectoras del anticuerpo (por ejemplo, la unión al complejo C1 de complemento, que incluye CDC, y la unión a los receptores FcγR, que son responsables de la modulación de la trayectoria ADCC) (Nose y Wigzell, 1983; Leatherbarrow y Dwek, 1983; Leatherbarrow *et al.*, 1985; Walker *et al.*, 1989; Carter *et al.*, 1992, *PNAS*, 89: 4285-4289).

Por consiguiente, otros medios para modular la función efectora de los anticuerpos incluyen alterar la glucosilación de la región constante del anticuerpo. La glucosilación alterada incluye, por ejemplo, una distribución o aumento en el número de restos glucosilados, y un cambio en el patrón o ubicación de los restos glucosilados, así como un cambio en la estructura o estructuras de azúcar. Los oligosacáridos encontrados en IgG humano afectan su grado de la función efectora (Raju, T. S. *BioProcess International* Abril 2003. 44-53); la microheterogeneidad de los oligosacáridos IgG humanos puede afectar las funciones biológicas tales como CDC y ADCC, la unión a varios receptores Fc y la unión a la proteína C1q (Wright A. & Morrison SL. *TIBTECH* 1997, 15 26-32; Shields *et al.*, *J Biol Chem.* 2001 276(9):6591-604; Shields *et al.*, *J Biol Chem.* 2002; 277(30):26733-40; Tonkawa *et al.*, *J Biol Chem.* 2003 278(5):3466-73; Amana *et al.*, *Nat Biotechnology.* 1999 Feb.; 17(2): 176-80). Por ejemplo, la capacidad de IgG de unirse a C1q y activar la cascada de complemento puede depender de la presencia, ausencia o modificación de la fracción de carbohidrato colocada entre los dos dominios CH2 (que está normalmente anclada en Asn297) (Ward y Ghetie, *Therapeutic Immunology* 2:77-94 (1995).

Los sitios de glucosilación en un polipéptido que contiene Fc, por ejemplo un anticuerpo tal como un anticuerpo IgG, pueden identificarse a través de técnicas convencionales. La identificación del sitio de glucosilación puede ser experimental o con base en análisis de secuencia o datos de modelación. Se han descrito los motivos consenso, es decir, la secuencia de aminoácido reconocida por varias glucosiltransferasas. Por ejemplo, el motivo consenso para un motivo de glucosilación enlazada a N es frecuentemente NXT o NXS, en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. También han sido descritos varios algoritmos para localizar un motivo de glucosilación potencial. Por consiguiente, para identificar los sitios de glucosilación potencial dentro de un anticuerpo o un fragmento que contiene Fc, la secuencia del anticuerpo se examina, por ejemplo, mediante el uso de bases de datos públicamente disponibles tales como el sitio web provisto por el centro para el análisis de secuencia biológica (ver servicios NetGlyc para pronosticar los sitios de glucosilación enlazados N y servicios NetOGlyc para pronosticar sitios de glucosilación enlazados a O).

Los estudios *in vivo* han confirmado la reducción en la función efectora de los anticuerpos de aglucosilo. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD8 de aglucosilo es incapaz de consumir las células que llevan CD8 en ratones (Isaacs, 1992 *J. Immunol.* 148:3062) y un anticuerpo anti-CD3 de aglucosilo no induce el síndrome de liberación de citocinas en ratones ni humanos (Boyd, 1995 *supra*; Friend, 1999 *Transplantation* 68:1632).

De manera importante, ya que la retirada de los glucanos en el dominio CH2 parece que tiene un efecto significativo en la función efectora, otras propiedades funcionales y físicas del anticuerpo permanecen inalteradas. Específicamente, se ha demostrado que la retirada de los glucanos tiene poco o ningún efecto sobre la vida media en suero y la unión al antígeno (Nose, 1983 *supra*; Tao, 1989 *supra*; Dorai, 1991 *supra*; Hand, 1992 *supra*; Hobbs, 1992 *Mol. Immunol.* 29:949).

Aunque existe una validación *in vivo* del método de aglucosilo, existen informes de la función efectora residual con mAb de aglucosilo (véase, por ejemplo, Pound, J. D. *et al.*, (1993) *Mol. Immunol* 30(3):233-41; Dorai, H. *et al.*, (1991) *Hybridoma* 10(2): 211-7). Armour *et al.* muestran la unión residual a proteínas FcγRIIa y FcγRIIb (*Eur. J. Immunol.* (1999) 29:2613-1624; *Mol. Immunol.* 40 (2003) 585-593). De esta forma una disminución adicional en función efectora, particularmente la activación complementaria, puede ser importante para garantizar la anulación completa de la actividad en algunos casos. Por esta razón, las formas de aglucosilo de IgG2 y IgG4 y un híbrido G1/G4 son visualizadas como útiles en métodos y composiciones de anticuerpo de la invención que tienen funciones efectoras reducidas.

Generación de anticuerpos anti-CD154 desglucosilados y de aglucosilo

Los anticuerpos anti-CD154 de la presente invención pueden modificarse o alterarse para producir una función o funciones efectoras reducidas (en comparación con un segundo anticuerpo específico de CD154) mientras opcionalmente retienen los otros atributos valiosos de la porción Fc.

Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a anticuerpos anti-CD154 de aglucosilo con una función efectora disminuida, que se caracteriza por una modificación del sitio enlazado a N conservado en los dominios CH2 de la porción Fc del anticuerpo. Una modificación del sitio enlazado a N conservado en los dominios CH2 del dímero Fc puede dar lugar a anticuerpos anti-CD154 de aglucosilo. Los ejemplos de dichas modificaciones incluyen la mutación del sitio enlazado a N conservado en los dominios CH2 del dímero Fc, la retirada de los glucanos unidos al sitio enlazado a N en los dominios CH2, y la prevención de la glucosilación. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD154 de aglucosilo puede crearse cambiando el sitio de Asn canónico enlazado a N en el dominio CH2 de cadena pesada a un resto Gln (véanse, por ejemplo, los documentos WO 05/03175 y US 2006-0193856).

En una realización de la presente invención, la modificación comprende una mutación en el sitio de glucosilación de cadena pesada para prevenir la glucosilación en el sitio. De esta forma, en una realización de esta invención, los anticuerpos anti-CD154 de aglucosilo se preparan mediante la mutación del sitio de glucosilación de cadena pesada, es decir, la mutación de N298Q (N297 utilizando la enumeración EU de Kabat) y expresados en una célula hospedadora apropiada. Por ejemplo, esta mutación puede lograrse siguiendo el protocolo recombinado por el fabricante para un kit de mutagénesis de sitio único de Amersham-Pharmacia Biotech® (Piscataway, NJ, USA).

El anticuerpo mutado puede expresarse establemente en una sola célula hospedadora (por ejemplo, una célula NSO o CHO) y después purificarse. Como un ejemplo, la purificación puede llevarse a cabo utilizando la proteína A y cromatografía de filtración con gel. Será evidente para los expertos en la materia que también pueden utilizarse métodos adicionales de expresión y purificación.

En otra realización de la presente invención, los anticuerpos anti-CD154 y de aglucosilo tienen una función efectora disminuida, en donde la modificación en el sitio enlazado a N conservado en los dominios CH2 de la porción Fc del anticuerpo o derivado de anticuerpo comprende la retirada de los glucanos del dominio CH2, es decir, su desglucosilación. Estos anticuerpos anti-CD154 de aglucosilo pueden generarse a través de métodos convencionales y después desglucosarse enzimáticamente. Los métodos para la desglucosilación enzimática de los anticuerpos son bien conocidos por los expertos en la materia (Williams, 1973; Winkelhake & Nicolson, 1976 J. Biol Chem. 251:1074-80.).

En otra realización de esta invención, la desglucosilación puede lograrse cultivando células hospedadoras que producen los anticuerpos en un medio de cultivo que comprende un inhibidor de glucosilación como la tunicamicina (Nose & Wigzell, 1983). Es decir, la modificación es la reducción o prevención de la glucosilación en el sitio enlazado a N conservado en los dominios CH2 de la porción Fc del anticuerpo.

En otras realizaciones de esta invención, los polipéptidos CD154 recombinantes (o células o membranas de células que contienen los polipéptidos) pueden utilizarse como un antígeno para generar un anticuerpo anti-CD154 o derivados de anticuerpo, que pueden después desglucosilarse.

En realizaciones alternativas, los anticuerpos anti-CD154 de aglucosilo o los anticuerpos anti-CD154 con glucosilación reducida de la presente invención, pueden producirse a través de los métodos descritos en Taylor y col., (documentos WO 05/18572 y US 2007-0048300). Por ejemplo, en una realización, un anticuerpo de aglucosilo anti-CD154 puede producirse alterando un primer resto de aminoácido (por ejemplo, mediante la sustitución, inserción, eliminación o a través de modificación química), en donde el primer resto de aminoácido alterado inhibe la glucosilación del segundo resto ya sea a través de una inhibición estérica o carga o ambos. En ciertas realizaciones el primer resto de aminoácido se modifica a través de la sustitución del aminoácido. En realizaciones adicionales, la sustitución del aminoácido se selecciona del grupo que consiste en Gly, Ala, Val, Leu, He, Phe, Asn, Gln, Trp, Pro, Ser, Thr, Tyr, Cys, Met, Asp, Glu, Lys, Arg, e His. En otras realizaciones, la sustitución del aminoácido es un resto de aminoácido no tradicional. El segundo resto de aminoácido puede estar cerca o dentro de un motivo de glucosilación, por ejemplo, un motivo de glucosilación enlazado a N que contiene la secuencia de aminoácido NXT o NXS. En una realización ejemplar, el primer resto de aminoácido es el aminoácido 299 y el segundo resto de aminoácido es el aminoácido 297, de acuerdo con la enumeración de Kabat. Por ejemplo, la primera sustitución del aminoácido puede ser T299A, T299N, T299G, T299Y, T299C, T299H, T299E, T299D, T299K, T299R, T299G, T299I, T299L, T299M, T299F, T299P, T299W, y T299V, de acuerdo la enumeración de Kabat. En realizaciones particulares, la sustitución del aminoácido es T299C.

La función efectora también puede reducirse modificando un anticuerpo de la presente invención de tal forma que el anticuerpo contenga una fracción de bloqueo. Las fracciones de bloqueo ejemplares incluyen fracciones de volumen y/o carga suficiente de tal forma que ocurre la glucosilación reducida, por ejemplo, mediante el bloqueo de la capacidad de una glucosidasa para glucosilar el polipéptido. La fracción de bloqueo adicional o alternativamente reduce la función efectora, por ejemplo, inhibiendo la capacidad de la región Fc para unir un receptor en una proteína de complemento. En algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere a una proteína de unión a CD154, por ejemplo, un

anticuerpo anti-CD154, que comprende una secuencia CDR3 de cadena pesada seleccionada de SEQ ID NO: 5, 44 y 50, y una región FC variante, la región Fc variante comprende un primer resto de aminoácido y un sitio de N-glucosilación, el primer resto de aminoácido modificado con química de cadena lateral para lograr un volumen estérico aumentado o carga electrostática aumentada comparada con el primer resto de aminoácido no modificado, por lo tanto reduciendo el nivel o por el contrario alterando la glucosilación en el sitio de N-glucosilación. En ciertas de estas de estas realizaciones, la región Fc variante confiere una función efectora reducida comparada con un control, la región Fc no variante. En realizaciones adicionales, la cadena lateral con un volumen estérico aumentado es una cadena lateral de un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Phe, Trp, His, Glu, Gln, Arg, Lys, Met y Tyr. En aún otras realizaciones adicionales, la química de cadena lateral con una carga electrostática aumentada es una cadena lateral de un resto de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp, Glu, Lys, Arg, y His.

Por consiguiente, en una realización, la glucosilación y la unión de Fc pueden modularse sustituyendo T299 con química de cadena lateral cargada tal como D, E, K, o R. El anticuerpo resultante tendrá glucosilación reducida así como una afinidad de unión Fc reducida a un receptor Fc debido a las interacciones electrostáticas desfavorables.

En otra realización, un anticuerpo variante T299C, que está tanto aglucosilado como capaz de formar un aducto de cisteína, puede exhibir una función efectora menor (por ejemplo, unión de FcγRI) en comparación con su contraparte de anticuerpo aglucosilado (véase, por ejemplo, el documento WO 05/18572). Por consiguiente, la alteración de un primer aminoácido próximo o un motivo de glucosilación puede inhibir la glucosilación del anticuerpo en un segundo resto de aminoácido; cuando el primer aminoácido es un resto de cisteína, el anticuerpo puede exhibir aún una función efectora reducida adicional. Además, la inhibición de la glucosilación de un anticuerpo del subtipo IgG4 puede tener un efecto aún más profundo sobre la unión de FcγRI en comparación con los efectos de la aglucosilación en otros subtipos.

En realizaciones adicionales, la presente invención se refiere a anticuerpos anti-CD154 con glucosilación alterada que exhiben una unión reducida a uno o más receptores FcR y que opcionalmente también exhiben una unión aumentada o normal a uno o más receptores Fc y/o complemento - por ejemplo, anticuerpos con glucosilación alterada que al menos mantienen una afinidad de unión igual o similar a uno o más receptores Fc y/o complemento como un nativo, anticuerpo anti-CD154 de control. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD154 con Man₅GlcNAc₂N-glucano predominante como la estructura de glucano presente (por ejemplo, en donde la estructura de Man₅GlcNAc₂N-glucano está presente a un nivel que es al menos aproximadamente 5% en moles más que en la siguiente estructura de glucano predominante de la composición Ig) puede exhibir una función efectora alterada comparada con una población de anticuerpo anti-CD154 en donde la estructura Man₅GlcNAc₂N-glucano no es predominante. Los anticuerpos que cuentan predominantemente con esta estructura de glucano exhiben una unión disminuida a FcγRIIa y FcγRIIb, una unión aumentada a FcγRIIIa y FcγRIIIb, y una unión disminuida a la subunidad C1q del complejo C1 (véase el documento US 2006-0257399). Esta estructura de glucano, cuando es la estructura de glucano predominante, confiere un ADCC aumentado, CDC aumentado, vida media en suero aumentada, una producción de anticuerpo de las células B aumentada, y una fagocitosis a través de macrófagos disminuida.

En general, las estructuras de glucosilación en una glicoproteína variarán dependiendo de la expresión del hospedador y las condiciones de cultivo (Raju, TS. BioProcess International Abril 2003. 44-53). Dichas diferencias pueden conducir a cambios tanto en la función efectora como en la farmacocinética (Israel *et al.*, Immunology. 1996; 89(4):573-578; Newkirk *et al.*, P. Clin. Exp. 1996; 106(2):259-64). Por ejemplo, la galactosilación puede variar con las condiciones del cultivo celular, que pueden convertir algunas composiciones de inmunoglobulina en inmunogénicas dependiendo de su patrón de galactosa específico (Patel *et al.*, 1992. Biochem J. 285:839-845). Las estructuras de oligosacárido de glicoproteínas producidas por células de mamífero no humano tienden a estar estrechamente relacionadas con las de las glicoproteínas humanas. Además, los sistemas hospedadores de expresión de proteína pueden modificarse o seleccionarse para expresar una glucoforma Ig predominante o alternativamente pueden producir glicoproteínas naturales que tienen estructuras de glucano predominantes. Los ejemplos de sistemas hospedadores de expresión de proteína modificados que producen una glicoproteína que tienen una glucoforma predominante incluyen desactivaciones/mutaciones de gen (Shields *et al.*, 2002, JBC, 277:26733-26740); modificación genética (Umana *et al.*, 1999, Nature Biotech., 17:176-180) o una combinación de ambos. Alternativamente, ciertas células expresan de manera natural una glucoforma predominante, por ejemplo, pollos, humanos y vacas (Raju *et al.*, 2000, Glycobiology, 10:477-486). De esta forma, la expresión de un anticuerpo o composición de anticuerpo que tienen una glucosilación alterada (por ejemplo, predominantemente una estructura de glucano específica) puede obtenerse por un experto en la materia seleccionando al menos uno de varios sistemas hospedadores de expresión. Los sistemas hospedadores de expresión de proteína que pueden usarse para producir anticuerpos anti-CD154 de la presente invención incluyen células animales, vegetales, de insecto, bacterianas y similares. Por ejemplo, los documentos US 2007-0065909, 2007-0020725, y 2005-0170464 describen la producción de moléculas de inmunoglobulina aglucosiladas en células bacterianas. Como un ejemplo más, Wright y Morrison produjeron anticuerpos en una línea celular deficiente en CHO en la glucosilación (1994 J Exp Med 180: 1087-1096) y mostraron que los anticuerpos producidos en esta línea celular fueron incapaces de realizar citotoxicidad mediada por el complemento. Otros ejemplos de sistemas hospedadores de expresión encontrados en la técnica para la producción de glicoproteínas incluyen: células CHO: Raju WO 99/22764 y Presta WO 03/35835; células de hibridoma: Trebak *et al.*, 1999, J. Immunol. Methods, 230: 59-70; células de insecto Hsu *et al.*, 1997, JBC, 272:9062-970, y células vegetales: Gerngross *et al.*, WO 04/74499. Debido a que una célula o extracto dados han resultado en la glucosilación de un motivo dado, están disponibles técnicas reconocidas en la

técnica para determinar si el motivo ha sido glucosilado, por ejemplo, utilizando electroforesis de gel y/o espectroscopía de masas.

5 Se describen métodos adicionales para alterar los sitios de glucosilación de los anticuerpos, por ejemplo, en los documentos US 6.350.861 y US 5.714.350, WO 05/18572 y WO 05/03175; estos métodos pueden utilizarse para producir anticuerpos anti-CD154 de la presente invención con glucosilación alterada, reducida, o sin glucosilación.

10 Los anticuerpos anti-CD154 de aglucosilo con una función efectora reducida pueden ser anticuerpos que comprenden modificaciones o que pueden conjugarse para comprender una fracción funcional. Las fracciones incluyen una fracción de bloqueo (por ejemplo, una fracción PEG, aductos de cisteína, etc.), una fracción detectable (por ejemplo, fracciones fluorescentes, fracciones radioisotópicas, fracciones radioopacas, etc., incluyendo fracciones de diagnóstico), y/o una fracción terapéutica (por ejemplo, agentes citotóxicos, agentes anti-inflamatorios, agentes inmunomoduladores, agentes anti-infecciosos, agentes anti-cancerígenos, agentes anti-neurodegenerativos, radionúclidos, etc.).

15 Conjugados de Anticuerpo

20 Cuando se administran, los anticuerpos por lo general son retirados rápidamente de la circulación y por consiguiente pueden provocar una actividad farmacológica relativamente corta. En consecuencia, pueden requerirse inyecciones frecuentes de dosis relativamente grandes de anticuerpos para sostener la eficacia terapéutica del tratamiento de anticuerpo.

25 En una realización de esta invención, los anticuerpos anti-CD154 de esta invención pueden ser anticuerpos modificados (por ejemplo, unidos a otras fracciones tales como la fracción funcional heteróloga) para aumentar la integridad y longevidad del anticuerpo *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD154 de esta invención pueden ser anticuerpos que están modificados para incluir una fracción (fracción funcional) que puede aumentar la estabilización, por lo tanto prolongando la vida media en suero del anticuerpo. La vida media en suero de una proteína de unión CD2154, por ejemplo, un anticuerpo, de la invención puede ser de al menos 3 días, al menos 7 días, al menos 14 días, al menos 21 días, al menos 28 días, al menos 1 mes o más. Las fracciones funcionales que aumentan la vida media de los anticuerpos pueden ser particularmente útiles en realizaciones en donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo.

35 Las modificaciones del anticuerpo también pueden aumentar la solubilidad de la proteína en una solución acuosa, eliminar la agregación, mejorar la estabilidad física y química de la proteína, y reducir enormemente la inmunogenicidad y la antigenicidad de la proteína. Como resultado, la actividad biológica *in vivo* deseada puede lograrse a través de la administración de aductos de polímero-proteína menos frecuentemente o en dosis inferiores que con la proteína no modificada.

40 Por consiguiente, en ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención son anticuerpos unidos a fracciones funcionales heterólogas para formar conjugados de anticuerpos. Una "fracción funcional" se refiere a cualquier fracción funcional (por ejemplo, polipéptido, dominio de proteína, vehículo, polímero, etc.) que está asociado con un anticuerpo de la invención. La asociación con un anticuerpo puede ser a través de una unión covalente o no covalente y también puede ser reversible o regulable. Las moléculas ejemplares que pueden utilizarse para formar conjugados de anticuerpo CD154 de la presente invención incluyen pero no se limitan a fracciones funcionales tales como, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo, enzimas, otro anticuerpo, derivados de anticuerpo o fragmentos de anticuerpo, polímeros sintéticos (por ejemplo, PEG) o de origen natural, ácidos nucleicos y fragmentos de estos, por ejemplo ADN, ARN y fragmentos de los mismos, aptámeros, radionúclidos, particularmente, radiyoduro, radioisótopos, metales quilatados, nanopartículas y grupos reporteros tales como los compuestos fluorescentes o luminiscentes o compuestos que pueden detectarse a través de técnicas formadoras de imágenes tales como RMN o espectroscopia ESR.

50 En un ejemplo adicional, una fracción funcional a la cual los anticuerpos de la invención se conjugan puede aumentar la vida media del anticuerpo *in vivo*, y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o mejorar la distribución de un anticuerpo a través de la barrera epitelial al sistema inmune. Los ejemplos de fracciones funcionales adecuadas de este tipo incluyen polímero, dextrina, hidroxipropilmetacrilamida (HPMA), transferrina, albúmina, proteínas de unión a albúmina o compuestos de unión a albúmina tales como los descritos en PCT/GB2005/002084.

60 Cuando la fracción funcional es un polímero puede, en general, ser un polímero sintético de origen natural, por ejemplo, un polímero de polialquileno, polialquilenilo o polioxialquileno de cadena recta o ramificada opcionalmente sustituido o polisacárido ramificado o no ramificado, por ejemplo un homo- o hetero-polisacárido. Véase, por ejemplo, Veronese y Pasut, 2005, Drug Discovery Today, 10(21):1451-1458; Pasut *et al.*, 2004, Expert Opinion in Therapeutic Patents, 14(6):859-894.

65 Los sustituyentes opcionales particulares que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos antes mencionados incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxi.

Los ejemplos particulares de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol), poli(propilenglicol), poli(vinilalcohol) de

cadena recta o ramificada opcionalmente sustituidos o sus derivados, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido tal como metoxipoli(etilenglicol) o sus derivados.

5 Los polímeros de origen natural particulares incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o sus derivados. "Derivados" en este contexto pretende incluir derivados reactivos, por ejemplo, grupos reactivos selectivos de tiol tales como maleimidas y similares. El grupo reactivo puede estar enlazado directamente o a través de un segmento enlazador al polímero. Se apreciará que el resto de cada grupo en algunas instancias formará parte del producto como el grupo enlazador entre el fragmento del anticuerpo y el polímero.

10 El tamaño del polímero puede variar según se desee, pero generalmente estará en un intervalo de peso molecular promedio de 500 Da a 50000 Da, preferentemente de 5000 Da a 40000 Da y más preferentemente de 20000 Da a 40000 Da. El tamaño del polímero en particular puede seleccionarse sobre las bases del uso previsto del producto, por ejemplo, la capacidad de localizar ciertos tejidos tales como tumores o la vida media circulante extendida (para una revisión véase Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). De esta forma, por ejemplo, cuando se prevé que el producto deje la circulación y penetre en el tejido, por ejemplo, para el uso en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso utilizar un polímero de peso molecular pequeño, por ejemplo, con un peso molecular de aproximadamente 5000 Da. Para aplicaciones en donde el producto permanece en la circulación, puede ser ventajoso utilizar un polímero de peso molecular más alto, por ejemplo, teniendo un peso molecular en el intervalo de 20000 Da a 40000 Da.

20 Los polímeros particularmente preferidos incluyen un polímero de polialquileo, tales como poli(etilenglicol) o, especialmente, un metoxipoli(etilenglicol) o uno de sus derivados, y especialmente, con un peso molecular en la escala de aproximadamente 15000 Da a aproximadamente 40000 Da.

25 Preferentemente, el anticuerpo, el derivado del anticuerpo o fragmento del anticuerpo de esta invención incluye un anticuerpo o fragmento con una función efectora reducida, que se une a un polímero de polialquileo, particularmente un poli(etilenglicol) (abreviado en el presente documento como PEG) o uno de sus derivados. En ciertas realizaciones, el anticuerpo, el derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de esta invención es un fragmento de anticuerpo que es un fragmento Fab' o F(ab')₂ o uno de sus derivados que se une a PEG, ya sea en la cadena pesada, en la cadena ligera o ambas. Este fragmento Fab' o F(ab')₂ del mismo puede ser humano o humanizado.

35 Por consiguiente, en ciertas realizaciones de esta invención, los anticuerpos anti-CD154 de esta invención son anticuerpos que se modifican a través de la unión covalente de fracciones funcionales tales como polímeros solubles en agua, tales como poli(etilenglicol), copolímeros de poli(etilenglicol) y poli(propilenglicol), carboximetil celulosa, dextrano, poli(vinilalcohol), poli(vinilpirrolidona) o poli(prolina), todos los cuales se sabe que exhiben vidas medias sustancialmente más largas en sangre tras inyección intravenosa que sus correspondientes proteínas no modificadas. Véase, por ejemplo, Abuchowski *et al.*, 1981. En: "Enzymes as Drugs", Holcenberg *et al.*, (ed.) 1981. Wiley-Interscience, New York, NY, 367-383 (1981); Anderson, W.F. 1992. *Human Gene Therapy*. *Science* 256:808-813; Newmark *et al.*, 1982. *J. Appl. Biochem.* 4:185-189; Katre *et al.*, 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 1487-1491.

40 En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos unidos a fracciones funcionales tales como fracciones de poli(etilenglicol) (PEG). En una realización particular, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y las moléculas PEG pueden unirse a través de cualquier grupo funcional de cadena lateral del aminoácido o aminoácido terminal localizado en el fragmento del anticuerpo, por ejemplo, cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Los aminoácidos pueden existir de manera natural en el fragmento de anticuerpo o pueden modificarse en el fragmento utilizando métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, el documento US 5.219.996; US 5.667.425; WO 98/25971). En otras realizaciones, el fragmento Fab de esta invención se modifica a través de la adición en el extremo terminal C de su cadena pesada uno o más aminoácidos para permitir la unión de una fracción funcional. Preferentemente, los aminoácidos adicionales forman una región bisagra modificada que contiene uno más restos de cisteína a los cuales puede unirse la fracción funcional. Se pueden utilizar múltiples sitios para unir dos o más moléculas PEG.

55 En ciertos aspectos de esta invención, las moléculas de PEG están covalentemente enlazadas a través de un grupo tiol de al menos un resto de cisteína localizado en un fragmento de anticuerpo de esta invención. Cada molécula de PEG unida al fragmento de anticuerpo modificado puede enlazarse covalentemente al átomo de azufre de un resto de cisteína localizado en el fragmento. El enlace covalente generalmente será un enlace de disulfuro, o, en particular, un enlace de azufre-carbono. Cuando se utiliza un grupo tiol como el punto de unión pueden utilizarse fracciones funcionales apropiadamente activas como, por ejemplo, derivados selectivos de tiol como derivados de maleimidas y cisteína. El PEG activado puede utilizarse como el material de partida en la preparación de fragmentos de anticuerpo modificados con PEG como se describe anteriormente. El PEG activado puede ser cualquier PEG que contiene un grupo reactivo tiol tal como ácido o éster α -halocarboxílico, por ejemplo, yodoacetamida, una imida, por ejemplo, maleimida, una vinilsulfona o un disulfuro. En ciertas realizaciones, un conjugado de anticuerpo anti-CD154 puede comprender dos moléculas de PEG con dos moléculas de maleimida. Los materiales de partida pueden obtenerse comercialmente (por ejemplo de Nektar, formerly Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA) o pueden prepararse de materiales de partida comercialmente disponibles utilizando procedimientos químicos convencionales. Las moléculas de PEG particulares incluyen 20K metoxi-PEG-amina (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater;

Rapp Polymere; y SunBio) y M-PEG-SPA (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater).

En una realización preferida, un anticuerpo de la invención es un fragmento Fab modificado que está PEGilado, es decir, tiene PEG (Poli(etilenglicol)) covalentemente unido al mismo, por ejemplo, de acuerdo con el método descrito en el documento EP 0948544 (véase también "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris y S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A. 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002, 54:531-545). En un ejemplo PEG se une a una cisteína en la región de conexión. En otro ejemplo, un fragmento Fab modificado con PEG tiene un grupo de maleimida covalentemente enlazado a un solo grupo tiol en una región bisagra modificada. Los restos de lisina pueden enlazarse covalentemente al grupo maleimida y a cada uno de los grupos amina en el resto de lisina puede unirse un polímero metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. El peso molecular total del PEG unido al fragmento Fab puede por consiguiente ser de aproximadamente 40.000 Da.

En otra realización, la fracción funcional es PEG y se une utilizando el método descrito en WO 98/25971 y WO 04/72116, a través del cual un grupo lisil-maleimida se une al resto de cisteína en el extremo terminal C de la cadena pesada, y cada grupo amino del resto de lisilo tiene covalentemente enlazado al mismo un resto metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 20.000 Da. El peso molecular total del PEG unido al anticuerpo por consiguiente es de aproximadamente 40.000 Da.

En otra realización, la fracción funcional es PEG y se une a un fragmento F(ab)₂ utilizando los métodos descritos en WO 98/25971 y WO 04/72116, a través del cual un grupo lisil-dimaleimida se une al resto de cisteína en el extremo terminal C de cada cadena pesada Fab, y cada grupo amino del resto de lisilo tiene covalentemente enlazado al mismo un resto metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 20.000 Da. El peso molecular total del PEG unido al anticuerpo F(ab)₂ por consiguiente es de aproximadamente 40.000 Da.

En ciertas realizaciones de esta invención, el anticuerpo de esta invención es un fragmento de anticuerpo, que puede ser completamente humano o humanizado, y está PEGilado, ya sea en la cadena pesada, la cadena ligera o ambas. En otras realizaciones, el fragmento de anticuerpo, puede ser completamente humano o humanizado, está PEGilado en una o ambas cadenas pesadas, o en una o en ambas cadenas ligeras, o en ambas cadenas pesadas y ligeras.

Por consiguiente, en ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-CD154 es un anticuerpo PEG enlazado (por ejemplo, un anticuerpo humano enlazado a PEG) en donde el PEG está enlazado al anticuerpo en un resto de cisteína o de lisina. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD154 PEGilado tiene un tamaño hidrodinámico de al menos 24 kD. En otras realizaciones, el PEG puede variar en un tamaño cualquiera de entre 20 a 60 kD (inclusive). En realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-CD154 enlazado a PEG tiene un tamaño hidrodinámico de al menos 200 kD. En las realizaciones de la presente invención en donde el anticuerpo anti-CD154 está enlazado a la fracción PEG, el anticuerpo anti-CD154 PEGilado puede tener una vida *in vivo* aumentada con relación a un anticuerpo anti-CD154 que carece de la fracción PEG.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona una proteína de unión a CD154 que comprende una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 15 y una secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO: 13, en donde la proteína está PEGilada.

Otras fracciones funcionales que pueden ser útiles en mejoramiento de la integridad y la longevidad de los anticuerpos de la presente invención *in vivo* incluye los polipéptidos. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD154 o fragmentos de anticuerpo de la invención pueden modificarse para incluir un polipéptido de albúmina de suero humano (HSA). Un conjugado de anticuerpo puede exhibir una estabilización aumentada y una vida media en el suero aumentada comparada con un anticuerpo no conjugado o fragmento de unión a antígeno. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-CD154 conjugado con HSA pueden exhibir una vida aumentada *in vivo* con relación a un anticuerpo anti-CD154 no conjugado. La vida (vida media t_{α} - o t_{β} -) del anticuerpo conjugado con HSA puede aumentarse en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o más. La vida media t_{α} puede estar dentro del intervalo de 0,25 minutos a 12 horas, por ejemplo, mientras la vida media t_{β} puede estar dentro de 12-48 horas, por ejemplo. La vida media t_{α} o t_{β} puede ser preferentemente de al menos 3 días, al menos 7 días, al menos 14 días, al menos 21 días, al menos 28 días, al menos 1 mes o más.

En algunas realizaciones de esta invención, los anticuerpos anti-CD154 de esta invención son anticuerpos modificados con una fracción funcional mediante el marcaje con un marcador detectable, por ejemplo, un isótopo radioactivo, enzima, colorante o biotina, u otro agente reactivo de afinidad.

En algunas realizaciones de esta invención, los anticuerpos anti-CD154 de esta invención son anticuerpos modificados con una fracción funcional a través de la cual se conjuga a un agente terapéutico, por ejemplo, un radio isótopo o radio núcleoido (por ejemplo, ¹¹¹In o ⁹⁰Y), una fracción de toxina (por ejemplo, toxoide de tétanos o ricina), un toxoide o un agente quimioterapéutico (documento U.S. 6.307.026).

En algunas realizaciones de esta invención, los anticuerpos anti-CD154 de esta invención son anticuerpos modificados al estar conjugados con un agente formador de imágenes. Los agentes formadores de imágenes pueden incluir, por ejemplo, una fracción de marcaje (por ejemplo, biotina, fracciones fluorescentes, fracciones radioactivas, una histidina, o una etiqueta myc u otras etiquetas de péptido) para facilitar aislamiento o detección.

Los ejemplos adicionales de fracciones funcionales para la modificación o conjugación de anticuerpos anti-CD514, pueden incluir serotoninas o agentes citotóxicos que incluyen cualquier agente que es perjudicial para las células (por ejemplo, las mata). Los ejemplos incluyen combrestatinas, dolastatinas, epotilonas, estaurosporina, maitansinoides, espongiestatinas, rizoxina, halicondrinas, roridinas, hemiassterlinas, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etoposida, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestorona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol, y puromicina y análogos u homólogos de estos.

Las fracciones funcionales útiles en la conjugación incluyen, pero no se limitan a, anti-folatos (por ejemplo, aminopterina y metotrexato), antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluoracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalan, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramycin (AMC), caliqueamicinas o diocarmicinas, CC-1065, enedieyenos, neocarzinostatina), y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Véase Garnett, 2001, *Advanced drug Delivery Reviews* 53:171-216 para detalles adicionales.

Otras fracciones funcionales pueden incluir radionúclidos quelados tales como ^{131}I , ^{111}In y ^{90}Y , Lu^{177} , Bismuto 213 , Californio 252 , Iridio 192 y Tungsteno 188 /Renio 188 , $^{211}\text{astatina}$; o fármacos tales como pero no limitándose a, alquilfosfolinas, inhibidores de topoisomerasa I, toxoides y suramina.

Las fracciones funcionales adicionales incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, pero no se limitan a, enzimas proteolíticas, hidrolasa, liasas, isomerasas, transferasas. Las proteínas, los polipéptidos y los péptidos de interés incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulina, toxinas tales como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas*, o una toxina diftérica, un maitanisinoide (por ejemplo, pero no limitándose a, DMI), una proteína tal como insulina, factor de necrosis tumoral, α -interferón, β -interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaqueta o activador de plasminógeno de tejido, un agente trombotico o un agente anti-angiogénico, por ejemplo angioestatina o endoestatina, angiogenina, gelonina, dolestaninas, aglutinantes de ranura menores, mostaza de bis-ido-fenol, o, un modificador de la respuesta biológica tal como linfocina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), factor estimulante de colonias de macrófagos granulocíticos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otros factores de crecimiento.

Otras fracciones funcionales pueden incluir sustancias detectables útiles, por ejemplo, en el diagnóstico. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, núclidos radioactivos, metales emisores de positrón (para utilizarse en la tomografía de emisión de positrón), e iones metálicos paramagnéticos no radioactivos. Véase generalmente el documento US 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con los anticuerpos para utilizarse como diagnóstico. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina de fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; los materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; los materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina, y aecurina; y los núclidos radioactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In y ^{99}Tc .

Ácidos Nucleicos

En ciertos aspectos, la presente invención se refiere a ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos anti-CD154 de la presente invención.

En consecuencia, en ciertas realizaciones la presente divulgación se refiere a una molécula de ADN aislada, recombinante y/o sintética que comprende una o más secuencia o secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 70 y SEQ ID NO: 73.

En otro aspecto, la divulgación representa un ácido nucleico aislado que comprende una o más secuencia o secuencias que codifican un polipéptido que incluye una secuencia de al menos un 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 % idéntica a la secuencia de una secuencia del dominio variable de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2; SEQ ID

NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58 o SEQ ID NO: 60 o una secuencia que hibrida (por ejemplo, en condiciones rigurosas) a un ácido nucleico que codifica la secuencia de un dominio variable de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: SEQ ID NO: 56 o SEQ ID NO: 60.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden además incluir secuencias reguladoras (por ejemplo, una secuencia promotora, una región 5' sin traducir, y una región 3' sin traducir) y/o secuencias de vector. Por ejemplo, el ácido nucleico constituye un vector. En realizaciones aún más adicionales, la invención se refiere a una célula hospedadora que comprende el vector. La célula hospedadora puede producir anticuerpo de tal forma que el anticuerpo exhibe una glucosilación reducida o nada de glucosilación (por ejemplo, si está presente una región Fc).

La presente divulgación también se refiere a variantes de secuencia de ácido nucleico descritas anteriormente. Por ejemplo, la presente invención incluye secuencias de ácido nucleico que son de aproximadamente un 75 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 91 %, aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 93 %, aproximadamente un 94 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 %, 99,5 %, 99,9 % o 100 % idénticas a cualquiera de las secuencias provistas en el presente documento, incluyendo sus fragmentos y complementos. La presente invención también incluye ácidos nucleicos que varían de las secuencias específicamente provistas en el presente documento debido a la degeneración del código genético.

Además, la presente invención incluye secuencias que hibridan específicamente con cualquiera de los ácidos nucleicos provistos en el presente documento. La frase "hibrida específicamente" se refiere a la capacidad de la secuencia de ácido nucleico para hibridar con al menos 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o 100 nucleótidos consecutivos de una secuencia provista en el presente documento, o una secuencia complementaria de la misma, de tal forma que tiene menos del 15 %, preferentemente menos del 10 %, y más preferentemente menos del 5 % de hibridación de fondo para el ácido nucleico de control (por ejemplo, ADN no específico o ADN diferente de la secuencia de anticuerpo específica provista en el presente documento). Puede usarse una diversidad de condiciones de hibridación para detectar una hibridación específica, y la severidad se determina principalmente por la etapa de lavado del ensayo de hibridación. Generalmente las altas temperaturas y las bajas concentraciones de sal dan una alta severidad, mientras las bajas temperaturas y las altas concentraciones de sal dan una severidad baja. La hibridación de severidad baja se logra lavando en, por ejemplo aproximadamente 2,0 x SSC a 50 °C, y la alta severidad se logra con aproximadamente 0,2 x SSC a 50 °C.

Los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión a CD154 de la presente invención pueden comprender una secuencia líder o de señal. La secuencia líder y de señal pueden variar y pueden sustituirse con una secuencia líder alternativa, y se entiende que, en ciertas realizaciones, las proteínas CD154 de la presente invención comprenden secuencias sin la secuencia líder. Puede utilizarse cualquier secuencia líder o de señal alternativa adecuada.

Células hospedadoras

La presente divulgación se refiere a células hospedadoras modificadas genéticamente para expresar cualquiera de las moléculas de ADN provistas en la Figuras 2-8, 10, 11 y 13-16, incluyendo las variantes de secuencia de las mismas.

También se proporcionan las células hospedadoras que expresan los anticuerpos anti-CD154 de esta invención. Ya sea una proteína de unión o un anticuerpo, puede comprender solamente una cadena, en cuyo caso, solamente la secuencia de ADN que codifica la cadena de polipéptido necesita utilizarse para transfectar la célula. Para la producción de anticuerpos que comprenden dos cadenas, la línea celular puede transfectarse con dos vectores. Alternativamente, cuando es apropiado, un solo vector puede codificar ambas secuencias de cadena, por ejemplo, cadena ligera y pesada de un anticuerpo anti-CD154, y las variaciones dependen de la estructura del anticuerpo en particular a ser expresado. La célula hospedadora puede ser, por ejemplo, células procariontas tales como *E. coli*, u otras células microbianas, o células eucariotas que incluyen pero no se limitan a células de mamífero tales como de humano, ratón, mono, conejo, cabra, hámster o células de rata, células de insecto, células aviares, células vegetales y células eucariotas inferiores tales como las células fúngicas (véase a continuación). Se entiende que la maquinaria de la célula hospedadora es responsable de la glucosilación de las proteínas recombinantemente expresadas y de esta forma los patrones de glucosilación particulares pueden seleccionarse para además alterar la función efectora de los anticuerpos de la invención.

En algunas realizaciones de esta invención, las células hospedadoras útiles para poner en práctica la invención pueden ser, por ejemplo, (1) células bacterianas tales como células de *E. coli*, *Caulobacter crescentus*, especies de *Streptococci*, *Staphylococci*, *Streptomyces* y *Bacillus subtilis*, y *Salmonella typhimurium*; (2) células fúngicas y células de *Aspergillus*, células de levadura, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, otras especies de *Pichia*, *K. lactis*; (3) líneas celulares de insecto, tales como *Spodoptera frugiperda* — por ejemplo, las líneas celulares Sf9 y Sf21, y las células expresSF™ (Protein Sciences Corp., Meriden, CT, USA) — células S2 de *Drosophila*, y células de *Trichoplusia ni* High Five® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); (4) células de mamífero o (5) células vegetales.

Por consiguiente, las proteínas de unión a CD154, por ejemplo anticuerpos anti-CD154 de esta invención pueden producirse en cualquier célula hospedadora procariota o eucariota disponible capaz de ser modificada genéticamente para expresar secuencias de ácido nucleico exógenas. Las células hospedadoras eucariotas inferiores que se pueden utilizar para producir los anticuerpos anti-CD154 de la presente invención incluyen las células descritas en la técnica (Véase, por ejemplo, los documentos WO 02/00879, WO 03/056914, WO 04/074498, WO 04/074499, Choi *et al.*, 2003, PNAS, 100: 5022-5027; Hamilton *et al.*, 2003, Nature, 301:1244-1246 y Bobrowicz *et al.*, 2004, Glycobiology, 14: 757-766).

Las células de mamífero típicas incluyen las células COS1 y COS7, células de ovario de hámster chino (CHO), células de mieloma NS0, células NIH 3T3, células 293, células HEPG2, células HeLa, C127, 3T3, BHK, células de melanoma de Bowes, células L, MDCK, HEK293, W138, líneas celulares ES murinas (por ejemplo, de las cepas 129/SV, C57/BL6, DBA-1, 129/SVJ), K562, células Jurkat, y BW5147. La invención proporciona de esta forma células que expresan los anticuerpos de la presente invención, incluyendo pero no limitándose a células de hibridoma, células B, células de plasma, así como células huésped de mamífero y humanas modificadas por recombinación para expresar los anticuerpos de la presente invención (por ejemplo, células madre embrionarias adultas). Otras líneas celulares de mamífero útiles son bien conocidas y fácilmente disponibles de la Colección de Cultivo de Tipo Americano ("ATCC") (Manassas, VA, USA) y el National Institute of General Medical Sciences (NIGMS) Human Genetic Cell Repository at the Coriell Cell Repositories (Camden, NJ, USA). Estos tipos de célula solamente son representativos, y esta lista no pretende ser una lista exhaustiva.

Entre otras consideraciones, alguna de las cuales se describen anteriormente, una célula hospedadora puede seleccionarse por su capacidad para procesar el anticuerpo anti-CD154 expresado en una forma deseada. Además de la glucosilación modificada y la aglucosilación, las modificaciones post-desplazamiento del polipéptido incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, carboximetilación, fosforilación, lipidación, y acilación.

En otra realización de esta invención, los anticuerpos anti-CD154 de esta invención se preparan a través de la traducción sin células o se sintetizan *in Vitro*. Los genes que codifican estas proteínas pueden sintetizarse *in vitro*.

En otra realización, los anticuerpos anti-CD154 de esta invención se producen en bioreactores que contienen las células que expresan el anticuerpo, con el fin de facilitar la producción a gran escala.

En otra realización, los anticuerpos anti-CD154 de esta invención se producen en mamíferos genéticamente modificados o transgénicos (por ejemplo, cabras, vacas, ovejas) que expresan el anticuerpo en la leche, con el fin de facilitar la producción a gran escala de los anticuerpos anti-CD154 (US 5.827.690; Pollock *et al.*, 1999. J. Immunol. Meth. 231 (1-2):147-57).

Métodos Terapéuticos

En una realización de esta invención, un anticuerpo anti-CD154, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, es capaz de inhibir una respuesta inmune en un sujeto. El anticuerpo de esta invención, o la composición farmacéutica de la invención, se administra al sujeto en una cantidad inhibidora eficaz.

En ciertas realizaciones, una "cantidad inhibidora eficaz" de un anticuerpo anti-CD154, o composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, es cualquier cantidad que es eficaz para inhibir la interacción CD154-CD40 en el sujeto al cual se administra. Los métodos para determinar una "cantidad inhibidora" son bien conocidos por los expertos en la materia y dependen de factores que incluyen, pero no se limitan a: el tipo de sujeto involucrado, el tamaño y la edad del sujeto y las propiedades farmacocinéticas del agente terapéutico particular distribuido.

En otra realización específica de esta invención, un anticuerpo anti-CD154 de esta invención, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, es capaz de inhibir la respuesta inmune mediante la inhibición de la interacción CD154-CD40.

En una realización de esta invención, un anticuerpo anti-CD154, de esta invención o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, es capaz de inhibir la inflamación. Para los propósitos de esta invención, las respuestas inflamatorias se caracterizan por enrojecimiento, hinchazón, calor y dolor, como consecuencias de la dilatación capilar con edema y migración de leucocitos fagocíticos. Algunos ejemplos de respuesta inflamatorias incluyen: artritis, dermatitis de contacto, síndrome hiper-IgE, enfermedad inflamatoria del intestino, asma alérgica, y enfermedad inflamatoria idiopática. La enfermedad inflamatoria idiopática incluye, por ejemplo, psoriasis y lupus (por ejemplo, lupus sistémico eritematoso (SLE), lupus eritematoso inducido por fármaco, y lupus nefritis). Véase, por ejemplo, Gallin 1989. Fundamental Immunology, Capítulo 26, Raven Press, 2o. Ed., pp. 721-733, New York. Esta divulgación proporciona un método para tratar o prevenir un síntoma de lupus sistémico eritematoso (SLE) en un individuo, el método comprende administrar una proteína de unión a CD154 monovalente, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD154 monovalente a un individuo en una cantidad efectiva para tratar o prevenir un síntoma de SLE.

Algunos ejemplos de artritis incluyen: artritis reumatoide, artritis inflamatoria no reumatoide, artritis asociada a la enfermedad de Lyme y osteoartritis inflamatoria. Algunos ejemplos de enfermedad inflamatoria e idiopática incluyen:

psoriasis y lupus sistémico.

En una realización de esta invención, un anticuerpo anti-CD154 o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, es capaz de inhibir el rechazo por el sujeto de un órgano trasplantado.

5 En una realización más específica de esta invención, un anticuerpo anti-CD154 de esta invención, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, es capaz de inhibir el rechazo por el sujeto de un corazón, riñón, hígado, piel, células de islote pancreáticas o médula ósea trasplantados.

10 En una realización de esta invención, un anticuerpo anti-CD154 de esta invención, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, es capaz de inhibir la enfermedad de injerto contra hospedador en un sujeto.

En una realización de esta invención, un anticuerpo anti-CD154, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, es capaz de inhibir respuestas alérgicas, en un sujeto, por ejemplo, fiebre del heno o una alergia a penicilina u otros fármacos.

15 En una realización de esta invención, un anticuerpo anti-CD154 de esta invención, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, es capaz de inhibir la respuesta autoinmune en sujetos que sufren de la enfermedad autoinmune. En algunas realizaciones, la respuesta autoinmune está asociada a o deriva de una afección seleccionada del grupo que consiste en: artritis reumatoide, miastenia grave, lupus sistémico eritematoso, enfermedad de Graves, púrpura idiopática, trombocitopenia, anemia hemolítica, diabetes mellitus, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedades autoinmunes inducidas por fármaco, o lupus inducido por fármaco. En ciertas realizaciones, la respuesta autoinmune se asocia con o deriva de lupus sistémico eritematoso.

20 En una realización de esta invención, un anticuerpo anti-CD154 de esta invención, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, es capaz de inhibir una respuesta autoinmune en un sujeto que sufre de una respuesta autoinmune que deriva de una enfermedad infecciosa.

25 En una realización de esta invención, un anticuerpo anti-CD154 de esta invención, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, es capaz de inhibir una respuesta autoinmune en un sujeto que sufre de una respuesta autoinmune que se deriva del síndrome de Reiter, espondiloartritis, enfermedad de Lyme, infección VIH, sífilis, o tuberculosis.

30 En una realización de esta invención, un anticuerpo anti-CD154 de esta invención, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, es capaz de inhibir fibrosis en un sujeto.

35 Algunos ejemplos de fibrosis incluyen: fibrosis pulmonar o enfermedad fibrótica. Algunos ejemplos de fibrosis pulmonar incluyen: fibrosis pulmonar secundaria al síndrome de tensión respiratoria en adultos, fibrosis pulmonar inducida por fármacos, fibrosis pulmonar idiopática, o neumonitis de hipersensibilidad. Algunos ejemplos de enfermedad fibrótica incluyen: hepatitis C; hepatitis B; cirrosis; cirrosis del hígado secundaria a un insulto tóxico; cirrosis del hígado secundario a fármacos; cirrosis del hígado secundaria a una infección viral; y cirrosis del hígado secundaria a una enfermedad autoinmune.

40 En una realización de esta invención, un anticuerpo anti-CD154 de esta invención, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, es capaz de inhibir la enfermedad gastrointestinal. Algunos ejemplos de enfermedad gastrointestinal incluyen: desmotilidad esofágica, enfermedad inflamatoria del intestino (incluyendo enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa), gastritis, colitis colagenosa (incluyendo colitis linfocítica y colitis microscópica), enfermedad celiaca (también denominada enteropatía de gluten, enfermedad celiaca de bebedero, o intolerancia al gluten) y escleroderma.

45 En una realización de esta invención, un anticuerpo anti-CD154 de esta invención, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, es capaz de inhibir una enfermedad vascular. Algunos ejemplos de enfermedades vasculares incluyen: aterosclerosis, enfermedad de arteria renal, linfoma, trastornos isquémicos, y daño por reperusión. También se incluyen enfermedades del complejo vascular/inmunitario de colágeno tales como lupus sistémico eritematoso o crioglobulinemia.

50 En una realización de esta invención, un anticuerpo anti-CD154 de esta invención, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, es capaz de inhibir la proliferación de células de tumor de célula T en un sujeto que sufre de un cáncer de células T, por ejemplo, leucemia o linfoma de células T. Dicho anticuerpo anti-CD154, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, puede administrarse a un sujeto en una cantidad eficaz para inhibir la proliferación de las células T tumorales en ese sujeto.

55 En una realización de esta invención, un anticuerpo anti-CD154 de esta invención, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, es capaz de inhibir la infección vírica de las células T de un sujeto a través del virus linfotrópico de la célula T humana de tipo 1 (HTLV I). Dicho anticuerpo anti-CD154 o una composición farmacéutica

que comprende el anticuerpo puede administrarse al sujeto en una cantidad efectiva para inhibir la infección vírica.

5 En una realización de esta invención, un anticuerpo anti-CD154 de esta invención, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, es capaz de tomar imágenes de las células tumorales o de las células neoplásicas en un sujeto que expresa una proteína CD154 a la cual el anticuerpo de esta invención se une específicamente. Un método para formar imágenes de células tumorales o células neoplásicas en sujeto que comprende las etapas de: administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-CD154 de esta invención, o una composición que lo comprende, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo y una proteína en la superficie de las células tumorales o células neoplásicas; y la formación de imágenes de cualquier complejo de anticuerpo/proteína formado, por lo tanto formando imágenes de cualquier célula tumoral o célula neoplásica en el sujeto.

15 En una realización de esta invención, un anticuerpo anti-CD154 de esta invención, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, es capaz de detectar la presencia de células tumorales o células neoplásicas en un sujeto que expresa la proteína CD154 a la cual un anticuerpo de la invención específicamente se une. Un método para detectar la presencia de células tumorales o células neoplásicas en un sujeto comprende las etapas de: administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD154 de esta invención, o una composición farmacéutica que lo comprende, bajo condiciones que permite que la formación de un complejo entre el anticuerpo y una proteína; aclarar cualquier agente formador de imágenes no unido del sujeto; y detectar la presencia de cualquier complejo de anticuerpo/proteína formado, la presencia del complejo indica la presencia de células tumorales o células neoplásicas en el sujeto.

Composiciones Farmacéuticas

25 Esta invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-CD154, como se describe en esta invención.

30 En una realización de la invención, la composición farmacéutica comprende al menos un anticuerpo anti-CD154 de esta invención.

35 En una realización de esta invención, un anticuerpo anti-CD154 de aglucosilo (u otro anticuerpo anti-CD154 con una función efectora reducida) de la invención, o composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, es capaz de unirse a un antígeno CD154 (por ejemplo, el antígeno CD154 que se une específicamente a través del aglucosilo hu5c8 producido por la línea celular que tiene el N.º de Acceso ATCC PTA-4931), y en donde el anticuerpo anti-CD154 de aglucosilo se caracteriza por tener una mutación de N298Q (N298 utilizando la enumeración de Kabat EU) y que además exhibe una función efectora reducida como se describe en cualquier lugar en el presente documento.

40 En ciertas realizaciones de esta invención, un anticuerpo anti-CD154 de aglucosilo (u otro anticuerpo anti-CD154 con una función efectora reducida), o composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, no se une a un receptor efector. En una realización más específica, un anticuerpo anti-CD154 de aglucosilo, o composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, es capaz de unirse a la proteína CD154 que específicamente se une a través del aglucosilo hu5c8 producido por la línea celular que tiene el N.º de Acceso ATCC PTA-4931, y en donde el anticuerpo anti-CD154 de aglucosilo o composición farmacéutica no se une a un receptor efector.

45 En una realización específica de esta invención, un anticuerpo anti-CD154 de aglucosilo (u otro anticuerpo anti-CD154 o proteína de unión a CD154 con una función efectora reducida), o composición farmacéutica que comprende al anticuerpo, no causa trombosis, incluyendo eventos tromboembólicos. En una realización más específica de esta invención, un anticuerpo anti-CD154 de aglucosilo o composición farmacéutica que comprende al anticuerpo es capaz de unirse a la proteína CD154 que específicamente se une a través del aglucosilo hu5c8 producido por la línea celular que tiene el N.º de Acceso ATCC PTA-4931, en donde el anticuerpo anti-CD154 de aglucosilo o la composición farmacéutica no causa trombosis.

55 En otra realización de esta invención, las composiciones farmacéuticas además pueden comprender cualquiera o más de un vehículo, un adyuvante, un vehículo de distribución, un tampón, y/o un estabilizante farmacéuticamente aceptable. Las técnicas ejemplares para la formulación de administración de los anticuerpos de la presente invención pueden encontrarse, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

60 En una realización más particular de esta invención, el vehículo farmacéuticamente aceptable es solución salina tamponada con fosfato, solución salina fisiológica, agua, formulaciones de citrato/sacarosa/Tween y emulsiones, por ejemplo, emulsiones de aceite/agua.

65 En una realización de esta invención, la composición farmacéutica puede distribuirse en un dispositivo de microencapsulación para así reducir o evitar una respuesta inmune del hospedador contra la composición. Los agentes de aglutinamiento, tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de esta invención, también pueden distribuirse microencapsulados en una membrana, tales como por ejemplo, un liposoma u otro vehículo de distribución

encapsulado, o inmunoprotegido.

5 En una realización de esta invención, la composición farmacéutica puede estar en forma de una preparación inyectable estéril, por ejemplo, una suspensión acuosa u oleaginoso inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse de acuerdo con las técnicas conocidas en la técnica utilizando agentes de dispersión, humectación, y suspensión adecuados.

10 En una realización de esta invención, la composición farmacéutica puede distribuirse oral, tópica o intravenosamente. Cuando se administra sistémicamente, la composición terapéutica deberá ser estéril, sustancialmente sin pirógeno y en una solución parenteralmente aceptable con respecto al pH, isotonicidad y estabilidad. Por ejemplo, una preparación farmacéutica está sustancialmente libre de materiales pirogénicos para así ser un adecuado para la administración como un terapéutico humano. Estas condiciones son conocidas por los expertos en la materia.

15 En una realización más específica de esta invención, para administración oral, la composición farmacéutica se formula en una cápsula, comprimido, suspensión o solución acuosa adecuada. Las formulaciones sólidas de las composiciones para administración oral pueden contener vehículos o excipientes adecuados, tales como almidón de maíz, gelatina, lactosa, goma arábiga, sacarosa, celulosa microcristalina, caolín, manitol, fosfato dicálcico, carbonato de calcio, cloruro de sodio, o ácido algínico. Los disgregantes que pueden utilizarse incluyen, sin limitación, celulosa microcristalina, almidón de maíz, glicolato de almidón de sodio, y ácido algínico. Los aglutinantes de comprimidos que pueden utilizarse incluyen goma arábiga, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, polivinilpirrolidona (Povidone™), hidroxipropil metilcelulosa, sacarosa, almidón, y etilcelulosa. Los lubricantes que pueden utilizarse incluyen estearatos de magnesio, ácido esteárico, fluido de silicio, talco, ceras, aceites y sílice coloidal.

25 En una realización más específica de esta invención, para aplicaciones tópicas, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en un ungüento adecuado. Algunos ejemplos de formulaciones de una composición para aplicación tópica incluyen: gotas, tintes, lociones, cremas, soluciones y ungüentos que contienen el principio activo y soportes y vehículos variados.

30 En una realización de esta invención, una formulación de ungüento semisólida tópica típicamente comprende una concentración del principio activo de aproximadamente 1 a 20 %, por ejemplo, de 5 a 10 %, en un vehículo, tal como una base de crema farmacéutica.

35 En una realización de esta invención, las composiciones farmacéuticas para inhalación y composiciones transdérmicas también pueden prepararse fácilmente. La composición terapéutica puede administrarse a través de la nariz o los pulmones, por ejemplo, como un líquido o aerosol en polvo (liofilizado).

40 En una realización de esta invención las formulaciones líquidas de una composición farmacéutica para administración oral preparadas en agua u otros vehículos acuosos pueden contener varios agentes de suspensión tales como metilcelulosa, alginatos, tragacanto, pectina, quelgina, carragenina, goma arábiga, polivinilpirrolidona, y alcohol polivinílico. Las formulaciones líquidas de las composiciones farmacéuticas de esta invención también incluyen soluciones, emulsiones, jarabes y elixires que contienen, junto con el compuesto o compuestos activos, agentes de humectación, edulcorantes, y agentes de coloración y saborizantes. Varias formulaciones líquidas y en polvo de las composiciones farmacéuticas pueden prepararse a través de métodos convencionales para la inhalación en los pulmones del mamífero a ser tratado.

45 En una realización de esta invención, las formulaciones líquidas de una composición farmacéutica para inyección pueden comprender varios vehículos tales como aceites vegetales, dimetilacetamida, dimetilformamida, etil lactato, etil carbonato, isopropil miristato, etano, polioles, es decir, glicerol, propilenglicol, polietileno glicol líquido y similares. En algunas realizaciones, la composición incluye un vehículo de citrato/sacarosa/Tween. Para inyecciones intravenosas, las versiones solubles en agua de las composiciones pueden administrarse a través de un método por goteo, a través del cual se infunde una formulación farmacéutica que contiene el antígeno de antifúngico y un excipiente fisiológicamente aceptable. Los excipientes fisiológicamente aceptables pueden incluir por ejemplo, 5 % de dextrosa, 0,9 % de solución salina, solución de Ringer u otros excipientes adecuados. Una forma insoluble adecuada de las composiciones puede prepararse y administrarse como una suspensión en una base acuosa o una base oleosa farmacéuticamente aceptable, tal como éster de un ácido graso de cadena larga, por ejemplo, etil oleato.

55 En una realización de esta invención, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 0,1 a 90 % en peso (tal como de 1 a 20 %, o de 1 a 10 %) de un anticuerpo anti-CD154 de esta invención, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

60 En una realización de esta invención, el porcentaje óptimo del anticuerpo anti-CD154 de esta invención en cada composición farmacéutica varía de acuerdo con la formulación misma y el efecto terapéutico deseado en las patologías específicas y regímenes terapéuticos correlacionados. La formulación farmacéutica está bien establecida en la técnica. Los métodos convencionales, conocidos por los expertos en la técnica de la medicina, pueden utilizarse para administrar la composición farmacéutica al sujeto.

65 Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se refieren a formulaciones de liberación

extendida. Por liberación extendida, liberación controlada o liberación lenta se refiere a las formulaciones de fármacos que liberan el fármaco activo, tal como un fármaco de polipéptido o anticuerpo, durante un periodo de tiempo después de la administración a un sujeto. La liberación extendida de los fármacos de polipéptido, que pueden ocurrir a través de un intervalo de tiempos deseados (por ejemplo, minutos, horas, días, semanas o más, dependiendo de la formulación de fármaco) difiere de formulaciones estándar en donde sustancialmente la unidad de dosificación completa está disponible para absorción o distribución inmediata a través de la corriente sanguínea. Las formulaciones de liberación extendida pueden, en ciertas realizaciones, resultar en un nivel del fármaco circulante de una administración individual que es sostenida, por ejemplo, por 8 horas o más, 12 horas o más, 24 horas o más, 36 horas o más, 48 horas o más, 60 horas o más, 72 horas o más, 84 horas o más, 96 horas o más, o aún por ejemplo, durante 1 semana o 2 semanas o más, por ejemplo 1 mes o más. Las composiciones de liberación extendida pueden comprender un anticuerpo anti-CD154 monovalente de la presente invención. En realizaciones adicionales, el anticuerpo monovalente es un anticuerpo humanizado o completamente humano. En realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-CD154, el anticuerpo anti-CD154 es un anticuerpo con una función efectora reducida como se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones de esta invención, la composición farmacéutica además comprende un compuesto inmunosupresor o inmunomodulador. Por ejemplo, un compuesto inmunosupresor o inmunomodulador puede ser uno de los siguientes: un agente que interrumpe la señalización coestimuladora de la célula T a través de CD28; un agente que interrumpe la señalización de la calcineurina, un corticoesteroide, un agente antiproliferativo, y un anticuerpo que específicamente se une a una proteína expresada en la superficie de las células inmunes, incluyendo pero no limitándose a CD45, CD2, IL2R, CD4, CD8 y RANK FcR, B7, CTLA4, TNF, LT β , y VLA-4.

En algunas realizaciones de esta invención, el compuesto inmunosupresor o inmunomodulador es tacrolimus, sirolimus, microfenolato mofetilo o su forma activa ácido micofenólico, mizorubina, desoxiespergualina, brequinar sodio, leflunomida, rapamicina o azaspirano.

En otras realizaciones de esta invención, los anticuerpos de esta invención o composiciones farmacéuticas que los comprenden pueden incluirse en un contenedor, paquete o dispensador solo o como parte de un kit con etiquetas e instrucciones para administración.

Rutas de Administración y Distribución

Los anticuerpos anti-CD154 de esta invención y las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse a un sujeto en cualquier forma que sea médicamente aceptable. Para los propósitos de esta invención "administración" significa cualquiera de los métodos estándar de administrar un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o composición farmacéutica conocida por los expertos en la materia, y no deberá limitarse a los ejemplos provistos en el presente documento.

En algunas realizaciones de esta invención, los anticuerpos anti-CD154 de esta invención y las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse a un sujeto a través de inyección intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intramedular, intraventricular, intraepidural, intraarterial, intravascular, intra-articular, intra-sinobial, intrasternal, intratecal, intrahepática, intraespinal, intratumoral, intracraneal; a través de rutas de administración enteral, intrapulmonar, transmucosal, intrauterina o sublingual, o localmente, por ejemplo, en sitios de inflamación o crecimiento de tumor.

En algunas realizaciones de esta invención, los anticuerpos anti-CD154 de esta invención y las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse a un sujeto oral o nasalmente, o a través de inhalación, ruta oftálmica, rectal o tópica.

En una realización más específica, los anticuerpos anti-CD154 de esta invención y las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse a un sujeto oralmente en la forma de cápsulas, comprimidos, suspensiones acuosas o soluciones.

En una realización más específica, los anticuerpos anti-CD154 de esta invención y las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse a un sujeto tópicamente a través de la aplicación de una crema, ungüento o similar.

En otras realizaciones de esta invención, los anticuerpos anti-CD154 de esta invención y las composiciones farmacéuticas de esta invención también pueden administrarse a través de inhalación a través del uso de un nebulizador, un inhalador de polvo seco o un inhalador con dosis medida.

En realizaciones adicionales de esta invención, los anticuerpos anti-CD154 de esta invención y las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse a un sujeto a través de administración de liberación sostenida, a través de medios como inyecciones de depósito de implantes erosionables directamente aplicados durante cirugía o través de implante de una bomba de infusión o un implante de liberación sostenida biocompatible en el sujeto.

En una realización más específica, los anticuerpos anti-CD154 de esta invención y las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse a un sujeto a través de rutas de depósito inyectables de administración, tales como a través de uso de materiales y métodos de depósito de 1, 3, o 6 meses inyectables o biodegradables.

5 En una realización más específica, los anticuerpos anti-CD154 de esta invención y las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse a un sujeto mediante la aplicación en la piel del sujeto de un parche transdérmico que contiene el anticuerpo, derivado de anticuerpo y composición farmacéutica, y dejar el parche en contacto con la piel del sujeto, generalmente de 1 a 5 horas por parche.

10 En otras realizaciones de esta invención, los anticuerpos anti-CD154 de esta invención y las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse a un sujeto en cualquier dosis por peso corporal y cualquier frecuencia de dosificación que sea médicamente aceptable. Las dosis aceptables incluyen un intervalo de entre aproximadamente 0,01 y 200 mg/kg del peso corporal del sujeto.

15 En cualquiera de los métodos para utilizar los anticuerpos o composiciones farmacéuticas de esta invención, los anticuerpos o composiciones farmacéuticas pueden administrarse a un sujeto en una sola dosis o múltiples dosis diariamente, cada 2, 3, 4, 5 o 6 días, semanal, mensualmente, o cualquier fracción o múltiplo de éstos, y además puede administrarse a un sujeto repetidamente a intervalos en la escala de cada día a cada mes alterno, como determine el médico experimentado.

20 En cualquiera de los métodos para utilizar los anticuerpos o composiciones farmacéuticas de esta invención, las proteínas de unión, anticuerpos, o composiciones farmacéuticas que los comprenden pueden administrarse a un sujeto que necesite los mismos a intervalos mientras sea un período tiempo médicamente indicado, en la escala de días o semanas a la vida del sujeto. En realizaciones adicionales, los anticuerpos anti-CD154 de esta invención y las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse a un sujeto repetidamente a intervalos en la escala de cada día a cada mes alterno.

25 En una realización de esta invención, los anticuerpos anti-CD154 de esta invención y las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse en dosis múltiples por día, si se desea, para lograr la dosis diaria deseada total. La eficacia del método de tratamiento puede evaluarse monitorizando al sujeto para signos conocidos o síntomas de un trastorno.

30 Para todas las realizaciones de esta invención, la dosificación y la velocidad de la dosis de los anticuerpos anti-CD154 de esta invención y las composiciones farmacéuticas de esta invención efectivas para producir los efectos deseados dependerán de una diversidad de factores, tales como la naturaleza de la enfermedad a ser tratada, el tamaño y la edad del sujeto, la diana del tratamiento, la composición farmacéutica específica utilizada, los farmacocinéticos del agente activo, y el juicio del médico que trata al sujeto.

35 Por consiguiente, los anticuerpos anti-CD154 de esta invención, y las composiciones farmacéuticas de esta invención, se administrarán en una cantidad eficaz para lograr su propósito previsto. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede referirse a una cantidad del anticuerpo efectiva para prevenir, aliviar o mitigar los síntomas de la enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede lograrse alterando la dosis y el programa de dosificación de la administración de los anticuerpos del sujeto.

40 Los anticuerpos anti-CD154 de esta invención y las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse como una sola dosificación para ciertas indicaciones, tales como prevenir la respuesta inmune a un antígeno al cual el sujeto está expuesto durante un tiempo breve, tal como un antígeno exógeno administrado en un solo día de tratamiento. Los ejemplos de dicha terapia incluirían la co-administración del fragmento de anticuerpo de la invención junto con un agente terapéutico, por ejemplo, un fármaco antigénico, un alérgeno o un producto sanguíneo, o un vector de terapia génica. En las indicaciones en donde el antígeno está crónicamente presente, tal como el control de la reacción inmune al tejido transplantado o fármacos antigénicos crónicamente administrados, los fragmentos de anticuerpo y las composiciones farmacéuticas de la invención se administran a intervalos durante el tiempo que el médico indique, en la escala de días a semanas a la vida del sujeto.

45 En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, los anticuerpos o composiciones farmacéuticas pueden administrarse a un sujeto con un segundo agente. En ciertas realizaciones, el agente es un agente terapéutico, tal como, por ejemplo, un agente inmunoregulador o inmunosupresor. Los agentes inmunomoduladores o inmunosupresores puede cualquiera de los siguientes:

50 (a) un agente que interrumpe la señalización coestimuladora de la célula T a través de CD28;
 (b) un agente que interrumpe la señalización de calcineurina,
 (c) un corticosteroide,
 (d) un agente anti-proliferativo; y
 (e) un anticuerpo que se une específicamente a una proteína expresada en la superficie de las células inmunes,
 55 incluyendo pero no limitándose a CD45, CD2, IL2R, CD4, CD8 y RANK FcR, B7, CTLA4, TNF, LTβ, y VLA-4. El compuesto inmunosupresor e inmunomodulador puede ser, por ejemplo, tacrolimo, sirolimo, micofenolato de

mofetilo, mizorubina, desoxiespergualina, brequinar sodio, leflunomida, rapamicina o azaspirano. El anticuerpo y el segundo agente pueden administrarse simultánea o secuencialmente.

5 En algunos casos, puede ser ventajoso administrar uno o más ácidos nucleicos de la invención a un sujeto que los necesite. Los métodos terapéutico y de diagnóstico de la invención que comprenden la etapa de administrar al menos un ácido nucleico de la invención de acuerdo con los métodos bien conocidos se incluyen en el alcance de la presente invención.

10 En una realización de esta invención, el sujeto o sujetos que pueden tratarse a través de los métodos antes descritos es un animal. Preferentemente el animal es un mamífero. Los ejemplos de mamíferos que pueden tratarse incluyen, pero no se limitan a humanos, primates no humanos, roedores (incluyendo ratas, ratones, hámster y conejillos de indias) vacas, caballos, ovejas, cabras, cerdos, perros y gatos. Preferentemente, el mamífero es un humano.

15 Esta invención puede entenderse mejor con base en los ejemplos siguientes. Sin embargo, un experto en la materia apreciará fácilmente que los métodos específicos y los resultados explicados son meramente ilustrativos de la invención como se describe en el presente documento.

EJEMPLOS

20 Los siguientes ejemplos ilustran los métodos y productos de la presente invención.

EJEMPLO 1: GENERACION DE ANTICUERPOS ANTI-HUMANOS-CD154 POR SLAM

25 El Método de Anticuerpo de Linfocito Seleccionado (SLAM, por sus siglas en inglés) (Babcock *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci, 93, 7843-7848; WO 92/02551; de Wildt *et al.*, 1997, J. Immunol. Methods, 207:61-67 y Lagerkvist, *et al.*, 1995, BioTechniques 18:862- 869) se utilizó para identificar y aislar células que producen anticuerpos de alta afinidad generados durante respuestas inmunes *in vivo* a ser aislados de cualquier especie. El anticuerpo individual aislado que produce células después se expande clónicamente seguido por filtración para esos clones que producen anticuerpos anti-CD154 seguido por la posterior identificación de la secuencia de sus genes de cadena pesada (V_H) y ligera (V_L) variables. Un método de filtración particular se detalla en el documento WO 04/051268. De esta forma se aislaron las células B que son positivas para anticuerpos para CD154 humano.

35 Varios anticuerpos CD154 anti-humanos de rata se identificaron y se aislaron utilizando la tecnología SLAM (Figura 12). Uno de estos anticuerpos, CA081 00342 (el "anticuerpo 342"), se humanizó como se describe en el siguiente ejemplo. Su ADN y secuencias de aminoácido deducidas se muestran en la Figura 2. Se clonó el gen que codifica este anticuerpo.

EJEMPLO 2: HUMANIZACIÓN DE CA081 00342 - CREACIÓN DE 342.G2

40 El anticuerpo SLAM 342 se humanizó injertando las CDR en los marcos de la línea germinal humana. Las alineaciones de la secuencia del anticuerpo (donador) de rata con los marcos de la línea germinal (acceptora) humana se muestran en la Figura 9, junto con la secuencia humanizada diseñada. La secuencia aceptora de la línea germinal de cadena ligera seleccionada fue la región VK1 2-1-(1) O12 V humana más la región JK1 J (V BASE, MRC Centre for Protein Engineering, UK; SEQ ID NO: 35 y 36) (Figura 3). La secuencia aceptora de la línea germinal de cadena pesada seleccionada fue la región VH3 1-1 3-66 V humana más la JH4 J (V BASE, MRC Centre for Protein Engineering, UK; SEQ ID NO: 37 y 38) (Figura 3). Además, se seleccionó un marco aceptor VH diferente, la secuencia VH4 1-1 4-59 humana (SEQ ID NO: 39 y 40) (Figura 3). Las CDR injertadas de la secuencia donadora a la aceptora son como se definen en Kabat (Kabat *et al.* Sequence of proteins of immunological interest (1987). Bethesda MD, National Institutes of Health, US), con la excepción de CDR-H1, en donde se utilizó la definición de Chothia/Kabat combinada (ver WO91/09967). Para injertos en donde se transfirieron solamente las CDR al anticuerpo donador sobre los marcos del aceptor, se construyeron versiones en las que los restos de marco de donador clave también se incluyeron. Estos restos se identificaron utilizando un método con base en el descrito en el documento WO 91/09967. Por ejemplo, el injerto de cadena ligera VKI gL4 que contiene restos donadores en las posiciones 38, 71 y 85; el injerto de cadena pesada VH3 gH1 que contiene restos de marcos donadores en las posiciones 24, 48, 49, 73 y 78; el injerto de cadena pesada VH4 gH1 que contiene marcos donadores en las posiciones 48, 71 y 78. Las secuencias de todos estos injertos se muestran en Figura 9.

60 Los genes que codifican estas secuencias de la región V se diseñaron y construyeron utilizando técnicas de biología molecular estándar contratando compañías para la síntesis de genes (Entelechon GmbH; ADN 2.0; Blue Heron). Las modificaciones para crear versiones injertadas se hicieron mediante mutagénesis dirigida a oligonucleótido estándar utilizando PCR. Las secuencias de péptido señal de anticuerpos de rata originales se incluyeron en los diseños de genes originales, para permitir la expresión utilizando vectores de expresión celular de mamífero.

65 Los genes de cadena ligera injertados se sub-clonaron en un vector de expresión de cadena ligera, que contiene ADN que codifica la región constante C-Kappa humana (Alotipo Km3). Los genes de cadena pesada injertados se sub-clonaron en el vector de expresión gamma-4 humano, que contiene ADN que codifica la región constante gamma-4

humana que contiene la mutación S241P de estabilización de conexión (Angal *et al.*, Mol Immunol. 1993, 30(1):105-8). Cualquier vector de expresión adecuado puede utilizarse. Los genes de anticuerpo de rata originales también se sub-clonaron en estos vectores, creando plásmidos que expresan el anticuerpo de la región V de rata quimérica/región C humana como un estándar de comparación en los ensayos.

La co-transfección de los plásmidos del gen de cadena ligera y el gen de cadena pesada en Células CHO1 permitió la expresión de IgG y el análisis de la unión de CD154 humana por Biacore®.

Con el fin de analizar la expresión en *E. coli* y la actividad como un Fab' monovalente, los genes para constructos clave se sub-clonaron en el vector de expresión pTTOD (Fab) (documentos WO 03/48208, WO 03/031475). La sub-clonación se logró en un proceso de dos fases: primero el fragmento del gen VK se clonó como un fragmento EcoRV - BsiWI; después el fragmento de gen VH se clonó como un fragmento PvuII - XhoI. Este proceso fusiona ADN de acuerdo con el péptido de señal de la proteína OmpA con los genes que codifican tanto la cadena ligera como pesada, confirieron la secreción de la proteína traducida al periplasma bacteriano. Los plásmidos de expresión resultantes se transformaron en la cepa W3110 K-12 de *E. coli* y se utilizó en la inducción de experimentos en frascos de agitación de pequeña escala y para fermentación de alta densidad celular.

Tabla 1

Afinidad de los constructos de 342 Fab por Biacore® ("Fab Purificado de fermentación IL)

Injerto gL4gHI	ka(l/Ms)	kd(l/s)	KD(M)	KD(pM)
	1,53E+07	6,97E-05	4,55E-12	4,55

La selección del injerto óptimo se hizo teniendo en cuenta tanto la actividad del ensayo como los niveles de expresión de Fab en fermentación de *E. coli*. Un ejemplo de determinación de afinidad por Biacore® se muestra en la Tabla 1. Sobre estas bases se eligió el injerto gL4gHI.

Se produjo un plásmido que codificaba una versión Fab' del injerto gL4gHI. La secuencia de ADN del inserto de inserción de este injerto se muestra en la Figura 8 (SEQ ID NO: 41). La Figura 8 también proporciona la secuencia de un inserto (SEQ ID NO: 28) para la expresión de un fragmento Fab, que se puede utilizar para fabricar un fragmento F(ab)₂.

EJEMPLO 3: CREACIÓN DE HU5C8 AGLUCOSILADO Y ANTICUERPOS HU342 POR MUTAGÉNESIS DIRIGIDA AL SITIO

Los anticuerpos hu5c8 y hu342 aglucosilados utilizados en los posteriores experimentos se crearon utilizando técnicas de ADN recombinante convencionales. El hu5c8 aglucosilado se hizo sustancialmente como se describe en el documento US2006/0193856, excepto por la sustitución del dominio Fc hulgG4 para el dominio Fc IgG1 previamente utilizado, con el fin de además reducir la función efectora. La secuencia de cadena ligera kappa del hu5c8 aglucosilado se muestran en la Figura 13 (SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 64). La cadena pesada del hu5c8 aglucosilado contiene dos mutaciones hechas por mutagénesis dirigida al sitio en los dominios CH2 (T299A, Kabat EU) y de conexión (S228P Kabat EU) (Figura 14; SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO: 67). La mutación T299A modifica el sitio de N-glucosilación en el dominio CH2 de tal forma que ya no es un sustrato para las enzimas N-glucosiladas, convirtiendo a la molécula aglucosilada.

El anticuerpo hu342 aglucosilado derivó del vector del fragmento 342 Fab. Esta secuencia se modificó por la adición de secuencias de señal humanas y las secuencias del dominio constante humano apropiadas. El anticuerpo hu342 aglucosilado también comprende un dominio Fc hulgG4. La secuencia de cadena ligera kappa del hu342 aglucosilado se muestra en la Figura 15 (SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 70). La cadena pesada del hu342 aglucosilado contiene dos mutaciones hechas por mutagénesis dirigida al sitio en el dominio de CH2 (T299A, Kabat EU) y de conexión (S228P Kabat EU) (Figura 16; SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72 y SEQ ID NO: 73). La mutación T299A modifica el sitio de N-glucosilación en el dominio CH2 por lo que ya no es un sustrato para las enzimas de N-glucosilación, convirtiendo a la molécula en aglucosilada. Ambos hu5c8 y hu342 aglucosilados se expresaron establemente en células CHO.

EJEMPLO 4: UNIÓN A CD154: MEDICIONES DE LA AFINIDAD DE UNIÓN

La tecnología Biacore® monitoriza la unión entre las biomoléculas en tiempo real y sin el requerimiento de marcaje. Uno de los interactuantes, denominado ligando, está ya sea directamente inmovilizado o capturado en la superficie inmovilizada mientras el otro, denominado analito, fluye en solución sobre la superficie capturada. El sensor detecta el cambio en masa en la superficie del sensor como el analito se une al ligando para formar un complejo en la superficie. Esto corresponde al procedimiento de asociación. El proceso de disociación se monitoriza cuando el analito se reemplaza por el tampón. En el ensayo Biacore® de afinidad, el ligando es un anticuerpo anti-CD154 tal como el anticuerpo 342 y el analito es el dominio extracelular del CD154 humano.

Los detalles del método son como siguen:

Instrumento: Biacore® 3000, Biacore AB, Uppsala, Suecia.

Chip Sensor: CM5 (grado de investigación) Número de Catálogo: BR-1001-14, Biacore AB, Uppsala, Suecia. Los chips se almacenaron a 4 °C.

5 **Solución de BIA normalización:** 70 % (p/p) de Glicerol. Parte del Kit de BIA mantenimiento Número de Catálogo: BR-1002-51, Biacore AB, Uppsala, Suecia. El kit de BIA mantenimiento se almacenó a 4 °C.

Kit de acoplamiento de amina: Número de catálogo: BR- 1000-50, Biacore AB, Uppsala, Suecia. Clorhidrato de Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). Se formó de 75 mg/ml en agua destilada y se almacenó en 200 µl de alícuotas a -70 °C. N-Hidroxisuccinimida (NHS). Formado por 11,5 mg/ml en agua destilada y se almacenó en 200 µl de alícuotas a -70 °C. 1M de clorhidrato de etanolamina –NaOH, pH 8,5. Se almacenó en 200 µl de alícuotas a -70 °C.

10 **Tampones:** el tampón corriente es HBS-EP (siendo 0,01 M de HEPES pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 3 mM de EDTA, 0,005 % de Agente tensioactivo P20). Número de catálogo: BR-1001-88, Biacore AB, Uppsala, Suecia. Tampón almacenado a 4 °C. El tampón de inmovilización es acetato 5,0 (siendo 10 mM de acetato de sodio pH 5,0). Número de catálogo: BR-1003-51, Biacore AB, Uppsala, Suecia. Tampón almacenado a 4 °C.

15 **Captura de ligando:** IgG anti-humano de cabra del fragmento Affinipure F(ab')₂, fragmento Fab' específico (Número de catálogo: 109-006-097) o fragmento Fc específico (Número de catálogo: 109-006-098), Jackson ImmunoResearch Inc (Pennsylvania, USA). Reactivos almacenados a 4 °C.

Ligando: anticuerpos anti-CD154.

20 **Analito:** Dominio extracelular recombinante de CD154 humano. El material se preparó a 2 mg/ml (40 µM) en solución salina tamponada con fosfato, almacenó a 4 °C, y diluyó en tampón corriente HBE-EP para los ensayos. Típicamente CD154 se diluyó de ~1 nM a ~ 100 pM duplicando las diluciones para en ensayo de afinidad.

Solución de Regeneración: 40 mM de HCl preparado por dilución con agua destilada de una solución concentrada de 11,6 M (BDH, Poole, Inglaterra. Número de catálogo: 101254H). Se prepararon 5 mM de NaOH por dilución con agua destilada de una solución concentrada de 50 mM. Número de catálogo: BR-1003-58, Biacore AB, Uppsala, Suecia.

25 **Método de Ensayo:** BIA (Análisis de Interacción Biomolecular) se llevó a cabo utilizando un Biacore® 3000 (Biacore AB). El IgG anti-humano de cabra del fragmento Affinipure F(ab')₂, o el fragmento Fc- o Fab'- específico (Jackson ImmunoResearch) se inmovilizaron en un Chip Sensor CM5 a través de química de acoplamiento de amina a un nivel de captura de ~6000 unidades de respuesta (RU). Se utilizó tampón HBS-EP (10 mM de HEPES pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 3 mM de EDTA, 0,005 % de agente tensioactivo P20, Biacore AB) como el tampón corriente con una velocidad de flujo de 10 µl/min. Se utilizaron los anticuerpos anti-CD154 o fragmentos Fab a concentraciones tales, que una vez capturados mediante la superficie de IgG-Fc anti-humano inmovilizado (o Fab' IgG anti-humano), dieron una señal de ~200 RU. El CD154 humano se tituló sobre el anticuerpo capturado, a varias concentraciones. Se inyectaron 90 µl de CD154 sobre la superficie (fase de asociación), seguido por una fase de disociación de 240 segundos, a una velocidad de flujo de 30 µl/min. La superficie se regeneró mediante dos inyecciones de 10 µl de 40 mM de HCl, seguido por una inyección de 5 µl de 5 mM de NaOH a una velocidad de flujo de 10 µl/min. Las curvas de unión de sustracción de fondo se analizaron utilizando el software de BIAevaluación (versión 3.2) siguiendo los procedimientos convencionales. Los parámetros cinéticos se determinaron del algoritmo de ajuste.

40 Este método puede utilizarse para evaluar la afinidad para la proteína CD154, o un fragmento de la misma, o cualquiera de un anticuerpo, derivado de anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de esta invención. Los valores K_d obtenidos por Biacore® para los anticuerpos anti-CD154 se aislaron por SLAM como se muestra en las Figuras 12 y 18.

EJEMPLO 5: INHIBICIÓN DE LA UNIÓN DE CD40

45 Se utilizó un ensayo basado en citometría de flujo para evaluar la unión de CD40 marcado a CD154 que expresa células D1.1. Las células D1.1 Jurkat (Colección de Cultivo Tipo Americano) se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Gibco, 31870-025) conteniendo 10 % (v/v) de suero bovino fetal (FCS), 2 mM de glutamina (Invitrogen, 23030024), 1 mM de piruvato de sodio (Invitrogen, 1 1360-039), 1 % (v/v) de D-(-)- glucosa (Sigma, G8769) y 10 mM de HEPES (Sigma, H0887). En el momento del ensayo, se incubaron 100.000 células D1.1 en 100 µl de medio RPMI 1640 + 10 % de FCS, en la presencia o ausencia del anticuerpo anti-CD154 diluido en serie durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se añadieron 5 µl de una dilución de 1:75 de hCD40-mFc-PE (Alexis Corp, ANC- 504-050) y se incubó durante 30 minutos más a temperatura ambiente. Después de lavar dos veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene 1 % (p/v) de albúmina de suero bovino (BSA fracción V, Serologicals Proteins Inc, 81-068-5) y 0,02 % (p/v) de azida de sodio (BDH, 103692K), las células se volvieron a suspender en 200 µl de PBS/1 %BSA/0,02 % de azida de sodio y se realizó la citometría de flujo en un Becton Dickinson FACScan. Los valores para la fluorescencia media promedio (FL2) se evaluaron en todos los casos. La inhibición de la unión de hCD40-mFc-PE se calculó con relación a la señal en ausencia del anticuerpo (0 % de inhibición) y a la señal en ausencia de hCD40-mFc-PE (100 % de inhibición), utilizando la fórmula:

$$\left[\frac{0\% \text{ Inhibición} - \% \text{ Prueba}}{0\% \text{ Inhibición} - 100\% \text{ Inhibición}} \right] \times 100$$

60 Los valores IC₅₀ de los datos se obtuvieron utilizando XLfit como parte del Paquete Base de Actividad.

Los valores IC50 de la unión de CD40 para los anticuerpos anti-CD154 aislados por SLAM se muestran en las Figuras 12 y 18.

EJEMPLO 6: ENSAYO DE UNION DE COMPETICIÓN

Se utilizó un ensayo basado en citometría de flujo para evaluar la unión del anticuerpo anti-CD154 a células D1.1 que expresan CD154. Las células D1.1 Jurkat (Colección de Cultivo de Tipo Americano) se mantuvieron en medio RPMI-1640 (Gibco, 31870-025) conteniendo 10 % (v/v) suero de becerro fetal (FCS), 2 mM de glutamina (BioWhittaker, 17-605E) y 1 Penicilina-estreptomicina (Mediatech, 30002107). En el momento del ensayo, se incubaron 100.000 células D1.1 en 10 ml de PBS, 0,1 % de BSA, 0,02 % de azida de sodio (tampón FACS), en la presencia o ausencia del anticuerpo anti-CD154 serialmente diluido y fab anti-CD154 biotefido (clon 342) durante 2 horas a 4 °C. Las células se lavaron tres veces en tampón FACS con centrifugación a 290xg por 3 minutos entre lavados. Se agregó una dilución de 1:500 de conjugado de estreptavidina-R-ficoeritrina (Jackson ImmunoResearch, 016-110-084) en 150 µM de tampón FACS y las células se incubaron por una hora a 4 °C. Las células se lavaron una vez y se fijaron en PBS con 3 % de formaldehído a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las células se volvieron a suspender en tampón FACS y se corrieron en un FacsCalibur (BD). Los valores para la fluorescencia media geométrica (FL2) se evaluaron en todos los casos. La unión de Fab 342 a biotina se representó gráficamente enfrentada a la concentración del anticuerpo de competición para obtener las curvas de inhibición sigmoideas que se ajustaron para adaptar una cuarta curva de parámetro utilizando GraphPad Prism. Los valores IC₅₀ generados se muestran en la Figura 18.

EJEMPLO 7: ENSAYO DE REGULACIÓN POSITIVA ICAM-1

La capacidad de los anticuerpos anti-CD154 para inhibir las interacciones en superficie celular CD40L:CD40 se midió en un ensayo de potencia de co-cultivo *in vitro*. La ligación (por ejemplo, unión) de CD40 con CD154 (CD40L) activa los linfocitos B dando como resultado una regulación positiva de CD54 (ICAM-1) en la superficie celular y esta activación de célula B CD40L:CD40 B dependiente del contacto puede bloquearse mediante anti-CD154. Brevemente, las células de linfoma T Jurkat D1.1 (CRL- 10915, Colección de Cultivo de Tipo Americano (ATCC), Manassas, VA, USA) que expresan CD154 y células de linfoma B Ramos 2G6.4C10 (CRL- 1923, ATCC) que expresan CD40 se co-cultivaron en una incubadora a 37 °C con 5 % de CO₂ durante la noche a una proporción de 1:4 con titulaciones de Fab anti-CD154 o Ab intacta de control (hu5c8). El ensayo se llevó a cabo en placas de fondo redondo de 96 pocillos a una concentración de 1 X 10⁶ células/ml en medio RPMI completo (RPMI con 10 % de FBS, 1 % de L-glutamina, 1 % de piruvato de sodio y 10 mM de HEPES pH 6,8, Gibco BRL, Rockville, MD, USA). Al día siguiente las células se tiñeron durante una hora a 4°C con CD20 FITC (n.º 555622) y CD54 APC (n.º 559771) de BD Pharmingen (San Diego, CA, USA) a una concentración de 1:100 y 1:200 respectivamente en PBS que contiene 1 % de BSA y 0,1 % de azida de sodio. Las células se lavaron y fijaron con 1 % de paraformaldehído y se analizaron en un Citómetro FACScan Calibur (BD Biosciences). La fluorescencia media geométrica de las células Ramos (células positivas dobles) contra la concentración del anti-CD154 (CD40L) se ajustó a una curva de parámetros utilizando el software DeltaGraph (Red Rock Software, Salt Lake City, UT, USA) (Figuras 12 y 18). Los valores IC50 se utilizaron para determinar la potencia relativa de los anticuerpos anti-CD154.

EJEMPLO 8: ACTIVIDAD EN EL MODELO DE MONO CYNOMOLGUS DE RESPUESTA INMUNE

El modelo utilizado para demostrar la actividad *in vivo* se describe en Gobburu *et al.*, (1998) J Pharmacol Exp Therapeutics 286: 925. Los monos cynomolgus recibieron dosis i.v. individuales bien de solución salina, anticuerpo Hu5c8 o una respuesta de dosis de 342 Fab'-PEG, 4 horas antes del ataque con una sola dosis i.m. de 0,5 ml del toxoide tetánico (TT). Cada grupo de tratamiento contuvo 3 machos y 3 hembras. En el día 30, se les dio una segunda dosis del inhibidor, y los animales se volvieron a atacar con TT (la respuesta secundaria). Se tomaron muestras sanguíneas en los períodos de tiempo seleccionados durante hasta 50 días para análisis de ambas concentraciones anti-TT de IgG e IgM (Figuras 19 y 21). Los datos muestran que 342 Fab'-PEG inhibe la respuesta inmune de IgG y IgM a TT en forma dependiente de la dosis.

Los títulos anti-TT de IgG en monos cynomolgus también se midieron después del tratamiento con una sola dosis (20 mg/kg para hu5c8, aglucosilo 5c8 y aglucosilo 342 y 40 mg/kg para 342 Fab'-PEG y 342 DFM-PEG) de diversas formas de los anticuerpos anti-CD154 (Figura 20). La inhibición de la respuesta inmune TT se observó con todos los anticuerpos evaluados.

EJEMPLO 9: ENSAYO DE BLOQUEO CRUZADO CLASIFICANDO LA CÉLULA ACTIVADA POR FLUORESCENCIA

Las propiedades de unión de los fragmentos Fab' anti-CD154 de la invención se estudiaron por ensayos de anticuerpo de bloqueo cruzado. Brevemente, las células Jurkat D1.1 que expresan CD154 se incubaron bien con medio o 10 µg/ml del primer Fab' anti-CD154 no marcado durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de no lavar, se agregó una dilución óptima de un segundo Fab' anti-CD154 marcado Alexa Fluor 488 (300 ng/ml) durante 60 minutos. Las células después se lavaron y analizaron mediante citometría de flujo. Si el primer y el segundo Fab' se unen al mismo epítipo, el primer Fab' bloquea competitivamente la unión del segundo Fab'. Si los dos anticuerpos se unen a diferentes epítipos, el primer Fab' no bloqueará la unión del segundo Fab'. Si el segundo Fab' marcado ensayado es

342, se puede demostrar que el Fab' 342 está bloqueado de forma cruzada por el Fab' 338 (Figura 23B), 381 (Figura 23D) y 335 (Figura 23G) pero no está bloqueado por cruce por el Fab' 295 (no mostrado), 402 (Figura 23C), 300 (Figura 23E), 303 (Figura 23H) o 294 (Figura 23F). Cuando el Fab' marcado es hu5c8, el bloqueo por cruce por Fab' 338 (Figura 24A), 402 (Figura 24B), 381 (Figura 24C), 303 (Figura 24D), 335 (Figura 24E), 300 (Figura 24F) y 294 (Figura 24G) se puede demostrar. La prueba con A33 (un anticuerpo de control en comparación con el isotipo) confirma que no existe un bloqueo por cruce específico (Figuras 23A y 24H). Los anticuerpos 342 y hu5c8 compiten entre sí para unirse a CD154 independientemente de cuál fue el Fab' no marcado (primero) y marcado (segundo).

EJEMPLO 10: ANALISIS BIACORE® DE LA UNION DEL ANTICUERPO

El análisis Biacore® de la unión de anticuerpo 342 y hu5c8 a la proteína CD154 soluble (sCD154) (dominio extracelular; ECD) indicó que 342 desplazó la unión de hu5c8 a sCD154 cuando se añadió al segundo sCD154 (Figuras 25 A y B). hu5c8 no fue capaz de desplazar 342 de sCD154 cuando se añade al segundo sCD154 (Figura 25C). El anticuerpo 338 se comporta de manera similar a 342 con respecto a resultados no recíprocos en el ensayo de competición hu5c8.

El Fab Hu5c8 Fab se puede unir a un complejo 342 de longitud completa (FL)/sCD154 (Figura 25D). Este resultado sugiere que Fab hu5c8 no compete con el sitio de unión FL 342 cuando se añade primero FL 342. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, estos resultados sugieren que la unión de uno o dos brazos del trimero sCD154 por 342 no evita la unión de hu5c8 al brazo o brazos "libres".

Existe un ligero aumento (~20 RU) en la unión cuando el Fab hu5c8 es seguido por Fab' 342 (Figura 25E). Este resultado da origen a la posibilidad de que Fab' hu5c8 tenga una unión bloqueada de Fab' 342 o bien que Fab' 342 haya reemplazado a Fab' hu5c8 en el sCD154 capturado.

Ni Fab' 342 ni Fab' hu5c8 se unen al complejo CD40:sCD154 o afectan a la disociación del complejo en un ensayo de proteína. El hecho de que ni Fab' pueda unir el complejo CD40:sCD154 sugiere que tampoco ese complejo utiliza los tres brazos sCD154 o que el complejo obstaculiza estéricamente el acceso ya sea de cualquier Fab' a un brazo "libre".

EJEMPLO 11: ACTIVACIÓN DE PLAQUETAS HUMANA

Ensayo 1

La agregación de plaquetas puede medirse utilizando ensayos publicados (por ejemplo, Florian *et al.* (2005) Thrombosis Hemostasis 93: 1137). En un ensayo, las plaquetas se lavaron de plasma rico en plaquetas donadoras HEPES tampón salino en tubos recubiertos con BSA y se ajustó a 250.000 por microlitro (µl). Las plaquetas lavadas después se midieron con pipetas en un tubo agregómetro (Chrono-Log 490D) y la señal de rastreo se calibró a una agregación de porcentaje cero, utilizando tampón HEPES (ensayo) para el blanco. En este instrumento el tubo se mantuvo a 37,0 °C y una barra magnética siliconada agitó las plaquetas a 1000 rpm. Los complejos inmunitarios completamente formados (es decir, anticuerpo más el CD40L soluble humano recombinante), en 1:1 de estequiometría fue rhdCD40L que se trató como trimérico) se añadieron a las plaquetas y la agregación se evaluó como un rastro derivado de la densidad óptica de la solución. Específicamente, se añadieron 15 µl del complejo inmunitario a 285 µl de suspensión de plaqueta lavados de tal forma que después de la adición al tubo, la concentración final de sCD40L fue de 10 µg/ml y la del anticuerpo IgG fue de 27,8 µg/ml o 16,7 µg/ml para Fab'-PEG. Los datos muestran que la agregación ocurre en la presencia del anticuerpo Hu5c8 anti-CD40L de IgG intacto, pero con Fab'-PEG 342 (Figura 26).

Ensayo 2

En otro ensayo descrito en el documento WO 07/59332, la agregación de plaquetas se midió poniendo en contacto las plaquetas con un agente activador de plaqueta (por ejemplo, adenosina difosfato (ADP), colágeno, trombina, tromboxano, neurófilo elastasa, p-selectina, o convulxina), poniendo en contacto las plaquetas activadas con un anticuerpo anti-CD154, y después poniendo en contacto las plaquetas activadas con un agente de entrelazamiento (por ejemplo, CD154 soluble (sCD154), anticuerpo IgG anti-humano, anticuerpo anti-hFc, RF, célula accesoria positiva del receptor Fc, proteína A soluble, o receptor Fc humano soluble). La agregación después se cuantificó mediante sedimentación de plaquetas, en donde la sedimentación de las plaquetas indica la agregación de las plaquetas. El ensayo de agregación se realizó en plasma rico en plaquetas (PRP). Aproximadamente se recolectaron 50 ml de sangre completa en alícuotas en tubos vacutainer de 4,5 ml que contiene 0,5 ml de 3,8 % de citrato de sodio. El PRP se preparó centrifugando la sangre anticoagulada a 200 g durante 10 minutos y cosechando el sobrenadante. Para llevar a cabo el ensayo, el perfilador de agregación de plaquetas de 4 canales Biodata (PAP-4; Biodata Corp., Hatboro, PA) se blanqueó utilizando un tubo conteniendo solamente el plasma pobre en plaquetas (PPP). Se añadió una alícuota de 350 µl de PRP, que contiene aproximadamente 2 a 5 x 10⁸/ml de plaquetas, a un tubo conteniendo una barra de agitación. El anticuerpo anti-CD40L, IgG humano, suero humano normal, CD40-Fc, o anti-hFc se agregaron en un volumen total de 100 µl. El tubo cargado se colocó en la máquina y los componentes de reacción se mezclaron antes de la adición de ADP.

La agregación se inició con la adición de la concentración sub-óptima de ADP en 50 µl (la concentración final varía

para cada muestra individual). El perfilador de agregación tiene cuatro puertos, que pueden correr simultáneamente. Se generó un rastreo de agregación para cada muestra durante cuatro minutos siguiendo la adición de ADP. Al final del rastreo, el instrumento calcula el porcentaje de agregación comparando la transmisión de luz a través de la muestra con la transmisión de luz a través del PPP en blanco. Se llevó a cabo una titulación al inicio de cada experimento, y las posteriores ejecuciones se llevaron a cabo a una concentración ADP sub-óptima.

Los resultados de este ensayo se muestran en la Figura 27. El PRP se obtuvo de un individuo sano. La agregación se indujo con 0,75 μ M de ADP, que se determinó como siendo sub-óptima para este donador. Se evaluó un anticuerpo anti-CD154 de control positivo y un hlgG de control negativo a 200 μ g/ml y sCD154 a 30 μ g/ml. El anticuerpo anti-CD154 o hlgG se mezclaron con sCD154 recombinante no menos de 20 minutos antes de la adición al tubo que contiene PRP. Las barras representan las medias y las desviaciones estándar de dos puntos de datos. Los resultados muestran que mientras el IgG humano de control negativo (hlgG) y sCD154 juntos no tienen efecto sobre la agregación de plaquetas, el anticuerpo anti-CD154 de control positivo y de control negativo demuestran que este ensayo puede utilizarse para comparar el efecto relativo de los anticuerpos de la presente invención en la agregación de plaquetas.

Para determinar si las plaquetas expresan CD154 en su superficie, las plaquetas pueden incubarse con un anticuerpo anti-CD154 conjugado con biotina y la presencia del CD154 en superficie se determinó mediante la cuantificación del anticuerpo anti-CD40L biotefido unido. Por consiguiente, la expresión en superficie de CD154 se evaluó después de 1, 10, 20, 40, y 60 minutos de incubación con o sin 10 μ M de ADP. La expresión en superficie de CD40L fue detectable en plaquetas activadas con ADP tan pronto como un minuto después de la activación y aumentó con el tiempo. La unión del anticuerpo anti-CD154 conjugado con biotina es específica para CD154, como la preincubación del anticuerpo anti-CD154 conjugado con biotina inhibió la unión de las plaquetas activadas. La cantidad de CD154 en superficie detectada en plaquetas inactivadas ("en reposo") también aumentó con el tiempo. Este fenómeno es igualmente atribuible al nivel basal de la activación de plaquetas bajo las condiciones experimentales.

EJEMPLO 12: MÉTODOS PARA DETERMINAR LA FUNCIÓN EFECTORA ALTERADA DE ANTICUERPOS AGLUCOSILADOS Y OTRAS VARIANTES

El siguiente ejemplo describe ensayos útiles para la determinación y caracterización de la función o funciones efectoras de los anticuerpos aglucosilados y otras variantes modificadas de la invención.

La función efectora de los anticuerpos aglucosilados y otras variantes modificadas de la invención puede caracterizarse por la capacidad de los anticuerpos para unir un antígeno y también unir un receptor Fc o una molécula de complemento tal como C1q. En particular, las afinidades de unión de Fc γ R pueden medirse con ensayos con base en la capacidad del anticuerpo para formar un "puente" entre el antígeno CD154 y la célula que lleva el receptor Fc. La interacción de los anticuerpos de la presente invención con un FcR o con complemento también se puede medir por tecnología AlphaScreen® con base en perlas (Perkin Elmer®).

Ensayos de unión del receptor Fc

El ensayo de unión a Fc γ R puede llevarse a cabo cubriendo placas ELISA Maxisorb de 96 pocillos (Nalge-Nunc Rochester, NY, USA) con ligando humano CD154 soluble recombinante (por ejemplo, a una concentración de 1 μ g/ml durante la noche a 4 °C en PBS; Karpusas *et al.* 1995 Structure 3(10): 1031-1039 y 3(12): 1426 y Karpusas *et al.* 2001 Structure 9(4): 321-329). Las titulaciones de formas glucosiladas y aglucosiladas del anticuerpo anti-CD154 están unidas a CD154 durante 30 minutos a 37 °C, las placas después se lavan, y se mide la unión de células U937 (CD64+) marcadas con fluorescencia. Las células U937 pueden cultivarse en medio RPMI con 10 % de FBS, 10 mM de HEPES, L-glutamina, y penicilina/estreptomocina, divididas a 1:2, y activadas por un día antes del ensayo con 1000 unidades/ml de IFN γ para aumentar la expresión del receptor Fc (Fc γ RI).

En otra variación del ensayo, la capacidad de los anticuerpos de la invención para unirse a, o más bien, fallar al unirse a, aún otro receptor Fc, tal como, Fc γ RIII (CD16) puede llevarse a cabo utilizando el ensayo de puenteo anterior contra células T humanas marcadas con fluorescencia (células Jurkat) transfectadas con un constructo de expresión CD16. El ligando puede producirse mediante una monocapa de células de Ovario de Hámster Chino (CHO) que expresan CD154 cultivadas en placas de cultivo tisular de 96 pocillos (Corning Life Sciences Acton, MA, USA). Por ejemplo, las células CHO-CD154+ se sembraron en placas de 96 pocillos a 1x10⁵ células/ml y se cultivaron con confluencia en oc-MEM con 10 % de FBS dializado, 100 nM de metotrexato, L-glutamina, y penicilina/estreptomocina (Gibco-BRL Rockville, MD, USA). Las células CD16+ Jurkat se cultivaron en RPMI con 10 % de FBS, 400 pg/ml de Geneticina, 10 mM de HEPES, piruvato de sodio, L-glutamina, y penicilina/estreptomocina (Gibco-BRL) y se dividieron 1:2 un día antes de realizar el ensayo.

En los ensayos para ambos receptores, la células que llevan el receptor Fc pueden marcarse con acetoximetil éster de 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(γ -6)-carboxifluoresceína (BCECF-AM) (Molecular Probes Eugene, OR, USA) durante 20 minutos a 37 °C. Después de lavar para retirar el marcador en exceso, se incubaron 1x10⁵ de las células marcadas en el ensayo durante 30 minutos a 37 °C. Las células positivas Fc γ R se retiraron por lavado varias veces y las placas se leyeron en un lector de microplacas (Cytofluor 2350 Fluorescent Microplate Reader, Millipore Corporation Bedford, MA, USA) a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm.

Además de los ensayos descritos anteriormente, la unión de los anticuerpos de la presente invención a receptores Fc puede medirse en un formato de competición utilizando un AlphaScreen™ (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay; Perkin Elmer) o directamente utilizando Resonancia de Plasmón (Biacore®). Los ensayos Biacore pueden monitorizar la unión del receptor de analito para el anticuerpo capturado en un chip A/G de proteína utilizando un instrumento Biacore® 3000. Biacore® es un método bien establecido para caracterizar las interacciones de proteína-proteína (Myszka 1997 *Curr Opin Biotechnol.* 8:50-57; Malmberg & Borrebaeck 1995 *J Immunol Methods* 183:7-13), y ha sido utilizado exitosamente para medir la unión de los anticuerpos IgG a FcγRIII (Galon *et al.*, 1997 *Eur J Immunol.* 27:1928-1932). Por ejemplo, la proteína A/G se acopla covalentemente a un chip sensor (por ejemplo, un chip sensor CM5 utilizando química NHS). Un tampón (por ejemplo, HBS-EP (0,01 M de HEPES pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 3 mM de EDTA, 0,005 % v/v de Agente tensioactivo P20, Biacore®)), y un tampón de regeneración de chip (por ejemplo, Glicina 1,5 (10 mM de glicina-HCl, pH 1,5, Biacore®)) se utilizaron en el ensayo. Los anticuerpos anti-CD154 variantes con función efectora reducida y anticuerpos anti-CD154 de tipo silvestre o nativos se diluyeron a 100 nM en tampón corriente (por ejemplo, tampón HBS-EP) y se unen al chip de la proteína A/G por 5 min. Los receptores están unidos a la fase de asociación en series de concentraciones, seguido por una fase de disociación con tampón. Un ciclo sin anticuerpo proporciona una respuesta de la línea base. Los sensogramas pueden ajustarse globalmente a 1:1 del modelo de unión de Langmuir para obtener las constantes de disociación en equilibrio (K_D S) utilizando el software BIAevaluation v4.1 (Biacore®), por ejemplo.

Los ensayos AlphaScreen utilizan anticuerpo no marcado para competir en la interacción entre la unión de IgG biotestado con perlas de donador de estreptavidina y FcγR-His-GST unido a perlas del aceptor anti-GST. Un anticuerpo anti-CD154 nativo o de tipo silvestre (tal como un anticuerpo IgG1) se biotesta utilizando métodos convencionales y se dializa en PBS. Las perlas del aceptor anti-GST y perlas donadoras de estreptavidina están disponibles de vendedores comerciales y puede utilizarse a una concentración final de 20 µg/ml. FcγRI-His-GST, FcγRIIIa-His-GST, FcγRIIa-His-GST, o cualquier FcR marcado, en el tampón de ensayo IX (por ejemplo, 25 mM de HEPES, 100 mM de NaCl, 0,1 % de BSA, 0,01 % de Tween-20, pH 7,4) se distribuye en cada cavidad de una placa de 96 pocillos a una concentración final de 0,5 nM. El anticuerpo anti-CD154 de nativo o de tipo silvestre, el anticuerpo anti-CD154 variante, o el tampón se prepara como diluciones log ½ en tampón de ensayo 1X, y se alicuotaron directamente en cada cavidad. Después de una breve centrifugación, el anticuerpo anti-CD154 biotestado de tipo silvestre (por ejemplo, un anticuerpo IgG1) en tampón de ensayo 1X se añadió a cada cavidad a una concentración final de 5 nM. Se añadieron 100 µg/ml de perlas del aceptor anti-GST en cada cavidad, y la placa se incubó en la oscuridad durante una hora a temperatura ambiente. Se añadieron 100 µg/ml de perlas del donador de estreptavidina a cada placa y después de una breve centrifugación la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Las muestras de la reacción se transfirieron a placas opacas blancas, y la fluorescencia se leyó en un lector de microplacas Fusion™ Alpha-FP HT (Perkin Elmer). Los datos pueden normalizarse a la señal más alta (sin competición) y adaptarse a un modelo de competición de un sitio utilizando regresión no lineal con el software GraphPad Prism (GraphPad Software), por ejemplo.

Los expertos en la materia pueden llevar a cabo el ensayo anterior o ensayos similares para medir la unión de las variantes del anticuerpo a cualquier FcR, incluyendo por ejemplo, FcγRIIIa.

Ensayos de unión a C1q

El ensayo de unión a C1q se realizó cubriendo placas ELISA Maxisorb de 96 pocillos (Nalge-Nunc Rochester, NY, USA) con 50 µl del ligando humano CD154 soluble recombinante (Karpusas *et al.* *Structure*, 15; 3 (12): 1426 (1995) a 10 µg/ml durante la noche a 4 °C en PBS. Los pocillos se aspiraron y se lavaron tres veces con tampón de lavado (PBS, 0,05 % de Tween 20) y bloquearon durante al menos una hora con 200 µl/pocillo de tampón de bloqueo/diluyente (0,1 M de Na₂HPO₄, pH 7,0, 1 M de NaCl, 0,05 % de Tween 20, 0,1 % de gelatina). El anticuerpo a probar se diluyó en tampón de bloqueo/diluyente iniciando a 15 µg/ml con diluciones de 3 veces. Se añadieron 50 µl por pocillo, y las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente.

Después de la aspiración y el lavado anterior, se agregaron 50 µl/pocillo de 2 µg/ml de C1q humano Sigma (C0660) diluido en tampón de bloqueo/diluyente y se incubaron durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Después de la aspiración y lavado como anteriormente, se añadieron 50 µl/pocillo de anti C1q de oveja (Serotec AHP033), diluido 3.560 veces en tampón de bloqueo/diluyente. Después de la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente, los pocillos se aspiraron y lavaron como anteriormente. Después se añadieron 50 µl/pocillo de conjugado HRP de IgG de anti-oveja de burro (Jackson ImmunoResearch 713-035-147) diluidos a 1:10.000 en bloque/diluyente y los pocillos se incubaron durante 1 hora temperatura ambiente.

Después de aspirar y lavar como anteriormente, se añadieron 100 µl de sustrato TMB (420 µM de TMB, 0,004 % de H₂O₂ en 0,1 M de tampón de acetato de sodio/ácido cítrico, pH 4,9) y se incubaron por 2 minutos antes de detener la reacción con 100 µl de 2 N de ácido sulfúrico. La absorbancia se leyó a 450 nm con un instrumento Softmax PRO, y se utilizó el software Softmax para determinar la afinidad de la unión relativa (valor C) con un ajuste de 4 parámetros.

Un ensayo de unión C1q alternativo utiliza ELISA para determinar la unión de anti-CD154 a C1q pero no utiliza CD154 como un puente. Brevemente, las placas de ensayo pueden cubrirse durante la noche a 4°C con un anticuerpo variante o un anticuerpo parental (control) en el tampón de recubrimiento. Las placas después pueden lavarse y bloquearse.

Después del lavado, puede añadirse una alícuota de C1q humano a cada cavidad e incubarse durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de un lavado más, se pueden añadir 100 µl de un anticuerpo conjugado de peroxidasa C1q anti-complemento de oveja e incubarse durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa puede volverse a lavar con tampón de lavado y agregarse 100 µl de tampón que contiene OPD (diclorhidrato de O-fenilenediamina (Sigma)) a cada cavidad. La reacción de oxidación, observada por la aparición de un color amarillo, puede dejarse avanzar durante 30 minutos y detenerse mediante la adición de 100 µl de 4,5 NH₂SO₄. La absorbancia después puede leerse a (492-405) nm.

Una variante de anticuerpo ejemplar es una que despliega una “reducción significativa en la unión de C1q” en este ensayo. Una reducción significativa puede ser, en algunas realizaciones, aproximadamente 100 µg/ml de la variante del anticuerpo que despliega aproximadamente 50 veces o más de reducción en la unión de C1q en comparación con 100 µg/ml de un anticuerpo de control que tiene una región Fc de IgG1 no mutada. En la realización más preferida, la variante del polipéptido (es decir, anticuerpo) no une C1q, es decir, 100 µg/ml de la variante del anticuerpo despliega aproximadamente 100 veces o más de reducción en la unión de C1q en comparación con 100 µg/ml del anticuerpo de control.

Activación del complemento y CDC

Para evaluar la activación del complemento, puede llevarse a cabo un ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods 202:163 (1996). Brevemente, varias concentraciones de la variante del polipéptido (es decir, anticuerpo) y el complemento humano pueden diluirse con tampón. Las células que expresan el antígeno al cual la variante del polipéptido se une pueden diluirse a una densidad de aproximadamente 1 X 10⁶ células/ml. Las mezclas de la variante de polipéptido, complemento humano diluido y células que expresan el antígeno pueden agregarse a una placa de 96 pocillos de cultivo celular de fondo plano y dejar incubarse durante dos horas a 37 °C y 5 % de CO₂ para facilitar la lisis celular mediada por el complemento. Después pueden agregarse 50 µl de azul alamar (Accumed International) en cada pocillo e incubarse durante la noche a 37 °C. La absorbancia se mide utilizando un fluorómetro de 96 pocillos con excitación a 530 nm y emisión a 590 nm. Los resultados pueden expresarse en unidades de fluorescencia relativa (RFU). Las concentraciones de la muestra pueden calcularse de una curva estándar y la actividad porcentual según en comparación con el polipéptido no variante se reporta para la variante del polipéptido de interés.

EJEMPLO 13: MAPEO DEL SITIO DE UNIÓN DEL ANTICUERPO 342 EN PROTEINA CD154

Los experimentos se llevaron a cabo para identificar los restos de aminoácido en CD154 humano que son importantes en la unión de 342 utilizando proteínas CD154 quiméricas de humano-ratón. 342 se une con una alta afinidad a CD154 humano pero no se une a CD154 de ratón. Por consiguiente, al mutar los restos de ratón CD154 a los restos humanos correspondientes y medir el cambio en la afinidad de la proteína mutada para 342, pueden identificarse restos de unión importantes. Se seleccionaron seis grupos de mutantes en donde los restos humanos en las regiones seleccionadas se introdujeron en CD154 soluble de ratón (marcado 1-6 en Figura 28). Las proteínas CD154 solubles de humano y ratón no mutadas (sCD154) también se evaluaron. Las diferentes proteínas sCD154 se utilizaron en experimentos Biacore® utilizando 342 (en un formato IgG) inmovilizado en el chip y con los sobrenadantes de sCD154 en la fase de solución. Los resultados demuestran que la unión de 342 solamente ocurre con la introducción de restos del Grupo 5 humanos en el CD154 de ratón.

EJEMPLO 14: ENSAYO DE BLOQUEO CRUZADO ELISA DE COMPETICIÓN

Para demostrar el bloqueo cruzado de los Fab' 342 y 5c8, se utilizó ELISA de competición. En este ensayo, el anticuerpo anti-Myc 9E10 se recubrió en una placa ELISA. El CD154 marcado con Myc se capturó mediante este anticuerpo. Una serie de diluciones de Fab' 342 o 5c8 sin marcar se incubó con ya sea 1 nM de Fab' biotina o 0,3 nM de 5c8 de biotina en una placa durante 2 horas a temperatura ambiente en PBS, 0,05 % de Tween-20, 1 % de BSA. La placa se lavó y la cantidad del Fab 5c8 biotinado unido se determinó utilizando HRP de estreptavidina como un secundario. La señal se representó gráficamente y adaptó utilizando ya sea una hipérbola de unión de sitio o dos curvas de hipérbola de unión de sitio adaptadas con el software Prism (Graph Pad).

Se llevó a cabo una titulación del Fab' 342 de biotina en CD154 para determinar la concentración apropiada para el análisis de bloqueo cruzado (Figura 29A). Se encontró que una concentración de 1 nM como estado en la parte lineal de la curva. También se realizó una titulación del Fab' 5c8 de biotina en CD154 para determinar la concentración apropiada para el análisis de bloqueo cruzado (Figura 29B). Una concentración de 0,3 nM se encontró estando en la parte lineal de la curva. En un experimento para analizar el bloqueo cruzado del Fab' de 342 biotina y 5c8 biotina mediante el Fab' 342 sin marcar, el Fab' 342 inhibió la unión del Fab' 342 con una afinidad de 0,09 nM (Figura 29C). Fab' 342 inhibe la unión de 5c8 de biotina con dos afinidades, 0,134 nM y 76 nM (Figura 29C). El bloqueo cruzado de biotina 342 mediante Fab' 5c8 sin marcar se muestra en la Figura 29D. La concentración máxima del Fab' 5c8 en esta curva, 50 nM, es la cavidad por encima del punto de saturación para 5c8 y también es el pocillo por encima de la concentración de 1 nM de la biotina 342. La falta de la inhibición completa en estas concentraciones sugiere que 5c8 es incapaz de bloquear completamente todos los sitios de unión de 342 en CD40L.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-CD 154 o un fragmento de unión a CD 154 del mismo, que comprende:
- 5 (a) una secuencia del dominio V_H de acuerdo con SEQ ID NO: 1 de la Figura 5; y
(b) una secuencia de dominio V_L de acuerdo con SEQ ID NO: 2 de la Figura 6.
2. El anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:
- 10 (a) una secuencia de cadena pesada seleccionada de SEQ ID NO: 12 de la Figura 7, SEQ ID NO: 13 de la Figura 7 y SEQ ID NO: 72 de la Figura 16; y
(b) una secuencia de cadena ligera seleccionada de SEQ ID NO: 15 de la Figura 7 y SEQ ID NO: 69 de la Figura 15.
- 15 3. El anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende secuencias de cadena pesada y ligera seleccionadas de:
- 20 (a) SEQ ID NO: 12 de la Figura 7 y SEQ ID NO: 15 de la Figura 7, respectivamente;
(b) SEQ ID NO: 13 de la Figura 7 y SEQ ID NO: 15 de la Figura 7, respectivamente; y
(c) SEQ ID NO: 72 de la Figura 16 y SEQ ID NO: 69 de la Figura 15, respectivamente.
- 25 4. El anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende secuencias de cadena pesada y ligera de SEQ ID NO: 13 de la Figura 7 y SEQ ID NO: 15 de la Figura 7, respectivamente.
5. El anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, en donde:
- 30 (a) el anticuerpo anti-CD 154 es un anticuerpo anti-CD154 seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo multimérico, un anticuerpo heterodimérico, un anticuerpo hemidimérico, un anticuerpo tetravalente, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo de cadena única y derivados de los mismos; o
(b) el anticuerpo anti-CD 154 es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-CD 154 y dicho fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en Fab, F(ab)₂, Fab', F(ab')₂, F(ab')₃, Fd y Fv;
- 35 6. El anticuerpo anti-CD 154 de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo se modifican por una unión covalente de poli(etilenglicol) o un derivado del mismo.
- 40 7. El anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el anticuerpo CD 154 es un fragmento Fab' en donde un grupo tiol en una región bisagra modificada se une covalentemente a un grupo maleimida que está unido covalentemente a un resto lisina, en donde un polímero de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20 000 Da se fija a cada uno de los grupos amina de la lisina.
- 45 8. El anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:
- (a) el anticuerpo o el fragmento del mismo carece de una región Fc de inmunoglobulina; o
(b) el anticuerpo o el fragmento del mismo comprende una región Fc de inmunoglobulina seleccionada de una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, o deriva de una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
- 50 9. El anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo comprende además una región Fc variante que es una región Fc híbrida que comprende secuencias de más de un tipo de dominio Fc de Ig.
- 55 10. El anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo no están glucosilados.
- 60 11. El anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo se enlaza a un resto funcional seleccionado de un resto de bloqueo, un resto detectable, un resto terapéutico o una combinación de los mismos.
- 65 12. El anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el fragmento es una fusión de Fab, Fab', Fd, Fv, un scFv, un scFab o un scFab sin cisteína.
13. Una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del

mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12.

- 5 14. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el ácido nucleico es una molécula de ADN que codifica un anticuerpo anti-CD 154 o un fragmento de unión a CD 154 del mismo, comprendiendo la molécula de ADN una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 17 de la Figura 6, SEQ ID NO: 18 de la Figura 6, SEQ ID NO: 22 de la Figura 5, SEQ ID NO: 23 de la Figura 7, SEQ ID NO: 24 de la Figura 7, SEQ ID NO: 25 de la Figura 6, SEQ ID NO: 26 de la Figura 7, SEQ ID NO: 27 de la Figura 7, SEQ ID NO: 28 de la Figura 8, SEQ ID NO: 41 de la Figura 8, SEQ ID NO: 70 de la Figura 15 y SEQ ID NO: 73 de la Figura 16.
- 10 15. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 13 o una molécula de ADN de acuerdo con la reivindicación 14.
16. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 15.
- 15 17. Un método para producir un anticuerpo anti-CD 154 o un fragmento de unión a CD 154 del mismo, en donde dicho método comprende las etapas de:
- 20 (a) cultivar una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 16 en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo, por dicha célula hospedadora; y
- (b) recuperar el anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo.
- 25 18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la célula hospedadora es una célula procariota o una eucariota.
19. Una composición que comprende el anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y un vehículo farmacéutico adecuado.
- 30 20. La composición de acuerdo con la reivindicación 19, en donde dicha composición comprende además un compuesto o agente inmunosupresor o inmunomodulador adicional.
- 35 21. Uso del anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 o de la composición de acuerdo con la reivindicación 19 o 20 en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir una afección, un trastorno o una enfermedad humanos mediados en total o en parte por la señalización de CD40 o un síntoma de cualquiera de los anteriores, en donde dicha afección, trastorno o enfermedad es una respuesta inflamatoria o autoinmune o fibrosis.
- 40 22. El uso de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la respuesta inflamatoria o autoinmune o fibrosis se selecciona de artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, espondil artritis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, psoriasis, escleroderma, nefritis por lupus, púrpura trombocitopénico idiopático, enfermedad vascular y esclerosis múltiple.
- 45 23. El anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 o la composición de acuerdo con la reivindicación 19 o 20 para su uso en el tratamiento o la prevención de una afección, un trastorno o una enfermedad humanos mediados en total o en parte por la señalización de CD40 o un síntoma de cualquiera de los anteriores, en donde dicha afección, trastorno o enfermedad es una respuesta inflamatoria o autoinmune o fibrosis.
- 50 24. El anticuerpo anti-CD 154 o el fragmento de unión a CD 154 del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 o la composición de acuerdo con la reivindicación 19 o 20 para su uso en el tratamiento o la prevención de una respuesta inflamatoria o autoinmune o fibrosis de acuerdo con la reivindicación 23, en donde la respuesta inflamatoria o autoinmune o fibrosis se selecciona de artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, espondil artritis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, psoriasis, escleroderma, nefritis por lupus, púrpura trombocitopénico idiopático, enfermedad vascular y esclerosis múltiple.
- 55

FIGURA 1

Secuencias CDR para el anticuerpo 342 anti-CD154

Número de ID de secuencia	Descripción	Secuencia
SEQ ID NO: 3	CDR-H1	GFSSTNYHVH
SEQ ID NO: 4	CDR-H2	VIWGDGDTSYNSVLKS
SEQ ID NO: 5	CDR-H3	QLTHYYVLAA
SEQ ID NO: 6	CDR-L1	RASEDLYYNLA
SEQ ID NO: 7	CDR-L2	DTYRLAD
SEQ ID NO: 8	CDR-L3	QQYYKFPFT

Secuencias CDR para el anticuerpo 381anti-CD154

Número de ID de secuencia	Descripción	Secuencia
SEQ ID NO: 42	CDR-H1	GFTFSDYYMA
SEQ ID NO: 43	CDR-H2	SISYEGSSTYYGDSVKG
SEQ ID NO: 44	CDR-H3	HDDSPGYFFDY
SEQ ID NO: 45	CDR-L1	LAGEDISNVLA
SEQ ID NO: 46	CDR-L2	AANRLQD
SEQ ID NO: 47	CDR-L3	QQTFRYPLT

Secuencias CDR para el anticuerpo 338 anti-CD154

Número de ID de secuencia	Descripción	Secuencia
SEQ ID NO: 48	CDR-H1	GFSLTSHHIS
SEQ ID NO: 49	CDR-H2	VMWNDGGTLYNSALKS
SEQ ID NO: 50	CDR-H3	GKMHYYVLDA
SEQ ID NO: 51	CDR-L1	RTSEDIYSNLA
SEQ ID NO: 52	CDR-L2	DTNRLAD
SEQ ID NO: 53	CDR-L3	QHYSNFPWT

FIGURA 2

Secuencias de anticuerpo 342 anti-CD154 de rata

Número de ID de secuencia	Descripción	Secuencia
SEQ ID NO: 29 (342 pesada en la Figura 9)	región VH de Ab 342 de RATA	QVQLKESGPGLVQPSETLSLTCTVSGFSSTNYHVHWVRQPPGKSLEW MGVIWGDGDTSYNSVLKSRLSITRDTSRSQVFLKMSSLQTEDTATYY CARQLTHYYVLAAWGQGASVTVS
SEQ ID NO: 34	región VH de Ab 342 de RATA con secuencia señal	atggctgtcctgggtgctgttgcctctgcctgatgacatttccaagctg tgtcctgtcccaggtgcagctgaaggagt caggacctggcctggctgc agccctcagagaccctgtctctcacctgcactgtctctgggttctca tcaaccaattatcatgtgcactgggttcgacagcctccaggaaaaag tcttgagtggatgggagtaatatggggtgatggagacacatcatata attcagttctcaaatcccgactgagcatcaccagggacacctccagg agccaagtttcttaaaaatgagcagctctgcaaacggaggacactgc cacctactattgtgccaggcaattgactcattactatggttctggctg cctggggtcaaggagcttcagtcactgtctcg
SEQ ID NO: 32	región VH de Ab 342 de RATA sin secuencia señal	caggtgcagctgaaggagt caggacctggcctgggtgcagccctcaga gacctgtctctcacctgcactgtctctgggttctcatcaaccaatt atcatgtgcactgggttcgacagcctccaggaaaaagcttgagtgg atgggagtaatatggggtgatggagacacatcatataattcagttct caaatcccgactgagcatcaccagggacacctccaggagccaagttt tcttaaaaatgagcagctctgcaaacggaggacactgccacctactat tgtgccaggcaattgactcattactatggttctggctgcctggggtca aggagcttcagtcactgtctcg
SEQ ID NO: 30 (342 ligera en la Figura 9)	región VL de Ab 342 de RATA	DIQMTQSPASLSASLGETVTVECRASEDLYYNLAWYQRKPGNSPQLL IYDTRYRLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINTLPSGDVASYFCQQYYKF PFTFGSGTKLELK
SEQ ID NO: 33	región VL de Ab 342 de RATA con secuencia señal	atgggtgtgccactcatctcctggggttgggtgctactgtggattac agatgccatatgtgacatccagatgacacagctctccagcttcctgt ctgcatctctgggagaaactgtcaccgtcgaatgtcgagcaagtgag gacctttactataatttagcgtggatcagcggaaaccagggaaactc tcctcaactcctgatctatgatacatataggttggcagatggggtcc catcacggttcagtgccagtggtctggcacacagtttctctaaag ataaacaccctgccatctggagatgtcgcaagttatttctgtcaaca gtattacaaatttccattcacgttcggctcagggaccaagctggaac tgaaa
SEQ ID NO: 31	región VL de Ab 342 de RATA sin secuencia señal	gacatccagatgacacagctctccagcttcctgtctgcatctctggg agaaactgtcaccgtcgaatgtcgagcaagtgaggacctttactata attagcgtggatcagcggaaaccagggaaactctcctcaactcctg atctatgatacatataggttggcagatggggtcccatcacggttcag tggcagtggtctggcacacagtttctctaaagataaacaccctgc catctggagatgtcgcaagttatttctgtcaacagttatcaaaattt ccattcacgttcggctcagggaccaagctggaactgaaa

FIGURA 3

Secuencias marco aceptoras

Número de ID de secuencia	Descripción	Secuencia
SEQ ID NO: 35 (2 1 1 O12 en la Figura 9)	Marco aceptor 2-1-(1) O12 JK1 de VK1 humano	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 36	Marco aceptor 2-1-(1) O12 JK1 de VK1 humano	gacatccagatgacccagtctccatcctccctgct tgcactctgtaggagacagagtcaccatcacttgcc gggcaagtcagagcattagcagctatttaaattgg tatcagcagaaaccagggaaagcccctaagctcct gatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcc catcaagggtcagtgccagtgatctgggacagat ttcactctcaccatcagcagctctgcaacctgaaga ttttgcaacttactactgtcaacagagttacagta ccccttgacggttcggccaagggaccaaggtggaa atcaaa
SEQ ID NO: 37 (1-1 3-66 en la Figura 9)	Marco aceptor 1-1 3-66 JH4 de VK3 humano	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQ APGKGLEWVSVIYSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNLSRAEDTAVYYCARYFDYWQGTLVTVS
SEQ ID NO: 38	Marco aceptor 1-1 3-66 JH4 de VK3 humano	gagggtgcagctgggtggagtctgggggaggcttggt ccagcctggggggtccctgagactctcctgtgagc cctctggattcaccgtcagtagcaactacatgagc tgggtccgccaggctccagggaaagggctggagtg ggtctcagttatttatagcgggtgtagcacatact acgcagactccgtgaagggcagattcaccatctcc agagacaattccaagaacacgctgtatcttcaaat gaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtatt actgtgagagatactttgactactggggccagggga accctgggtcaccgtctcc
SEQ ID NO: 39 (1-1 4-59 en la Figura 9)	Marco aceptor 1-1 4-59 JH4 de VH4 humano	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQ PPGKGLEWIGYIYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARYFDYWQGTLVTVS
SEQ ID NO: 40	Marco aceptor 1-1 4-59 JH4 de VH4 humano	cagggtgcagctgcaggagtggggcccaggactggt gaagccttcggagaccctgtccctcactgcactg tctctgggtggctccatcagtagttactactggagc tggatccggcagccccagggaaagggactggagtg gattgggtatatctattacagtgaggacaccaact acaaccctccctcaagagtcgagtcaccatatca gtagacacgtccaagaaccagttctccctgaagct gagctctgtgaccgctgaggacacggcctgtatt actgtgagagatactttgactactggggccagggga accctgggtcaccgtctcc

FIGURA 4

Injertos de CDR 342 basados en marcos aceptores

Número de ID de secuencia	Descripción	Secuencia
SEQ ID NO: 10 (VH3 gH7 en la Figura 9)	CDR pesada variable basada solamente en injerto en marco aceptor VH3 1-1 3-66 JH4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFSSTNYHVHWV RQA PGKGLEWVSVI WGDGDTSYNSVLKSRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARQLTHYYVLA AWGQGT LVTVS
SEQ ID NO: 20	CDR pesada variable basada solamente en injerto en marco aceptor VH3 1-1 3-66 JH4	gaggtgcagctggctcagctcggaggcgggcttgtccagc ctgggtgggagcctgcgtctctcttgtgcagcgcgagcggctt cagctctaccaattaccatgtgcactgggtgcgtcaggca cctgggaagggcctggagtgggtgagtggtatttggggcg acggcgatacatcctacaactccgtcctgaagagccggtt caccatttcccgtagcaactcaagaataccctttacctc cagatgaactctctccgcgagaggacacagcagcttatt actgtgcagctcaactgacctactattacgttttggcagc ctggggctcaagggactctggctcacagtctcg
SEQ ID NO: 9	CDR pesada variable basada solamente en injerto en marco aceptor VH4 1-1 4-59 JH4	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSSSTNYHVHWI RQFPKGLEWIGVIWGDGDTSYNSVLKSRVTISVDT S KNQFSLKLSVTAADTAVYYCARQLTHYYVLA AWGQG TLVTVS
SEQ ID NO: 19	CDR pesada variable basada solamente en injerto en marco aceptor VH4 1-1 4-59 JH4	caggtgcagctgcaggagtctggaccggggcttgtca agcctagtgcagaccctgagcctcactgtaccgtgag cggcttcagctctaccaattaccatgtgcactggatt cgtcagccacctgggaagggcctggagtggattgggtg ttatttggggcgacggcgatacatcctacaactccgt cctgaagagccgtgtcaccatttccgttgacacctca aagaatcaattttccctcaagttgagctctgtcaccg cagcggacacagcagctctattactgtgcagctcaact gacctactattacgttttggcagcctgggtcaaggg actctggctcacagtctcg
SEQ ID NO: 14 (VK1 gL3 en la Figura 9)	CDR ligera variable basada solamente en injerto en marco aceptor VK1 2-1-(1) O12 JK1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDL YNLA WYQ QKPGKAPKLLIYD TYRLADGVPSRFS GSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQYYKFPFTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 16	CDR ligera variable basada solamente en injerto en marco aceptor VK1 2-1-(1) O12 JK1	gatataccagatgaccagagtccaagcagctctcctcg ccagcgtaggcgatcgtgtgactattacctgtcgtgc cagtgaggacctctattacaacctggcctggatcag caaaaaccgggcaaaagccccgaagctgctcatctatg atagctaccgcctggctgacgggtgtccaagccggtt cagtggcagtggcagcggactgactttaccctcaca atttcgtctctccagcgggaagatttcgccacttact attgtcagcaatattacaagttccctttcaccttcgg tcagggcactaaagtagaaatcaaa

FIGURA 5

342 gH1 basado en marcos aceptores

Número de ID de secuencia	Descripción	Secuencia
SEQ ID NO: 1 (VH3 gH1 en la Figura 9)	gh1 basado en marco aceptor VH3 1-1 3-66 JH4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSSTNYHV HWVRQAPGKGLEWMGVIWGDGDTSYNSVLKSRFT ISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLTHY YVLAAWGQGTLVTVS
SEQ ID NO: 22	gh1 basado en marco aceptor VH3 1-1 3-66 JH4	gaggtgcagctggtcgagctctggaggcgggcttgctcc agcctggtgggagcctgcgtctctctgtgcagtgag cggcttcagctctaccaattaccatgtgactgggtg cgtcaggcacctgggaagggcctggagtggatgggtg ttatttggggcgacggcgatacatcctacaactcctg cctgaagagccgtttcaccatttcccgtgacacctca aagaataccgtttacctccagatgaactctctccgcg cagaggacacagcagctctattactgtgcacgtcaact gacccactattacgttttggcagcctgggggtcaagg actctggtcacagtctcg
SEQ ID NO: 11 (VH4 gH1 en la Figura 9)	gh1 basado en marco aceptor VH4 1-1 4-59 JH4	QVQLQESGPGGLVVKPSETLSLTCTVSGFSSTNYHV HWIRQPPGKGLEWMGVIWGDGDTSYNSVLKSRVT ISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARQLTHY YVLAAWGQGTLVTVS
SEQ ID NO: 21	gh1 basado en marco aceptor VH4 1-1 4-59 JH4	caggtgcagctgcaggagtctggaccggggcttg tcaagcctagtgcagaccctgagcctcacttgtag cgtgagcggcttcagctctaccaattaccatgtg cactggattcgtcagccacctgggaagggcctgg agtggatgggtgttatttggggcgacggcgatac atcctacaactcctgctgaagagccgtgtcacc atttcccgtgacacctcaaagaatcaagtttccc tcaagttgagctctgtcaccgcagcggacacagc agtctattactgtgcacgtcaactgacccactat tacgttttggcagcctgggggtcaagggactctgg tcacagtctcg

FIGURA 6

342 gL4

Número de ID de secuencia	Descripción	Secuencia
SEQ ID NO: 2 (VK1 gL4 en la Figura 9)	gL4 Variable ligera	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDLYYNLA WYQRKPGKAPKLLIYDTRADGVPSRFSGSGSG TDYTLTISSLQPEDFASYQCQQYKFPFTFGQGT KVEIK
SEQ ID NO: 17	gL4 Variable ligera	gatatccagatgaccagagtccaagcagtctct ccgccagcgtaggcgatcgtgtgactattacctg tcgtgccagtgaggacctctattacaacctggcc tggatcagcgtaaaccgggcaaagccccgaagc tgctcatctatgatacgtaccgctggctgacgg tgtgccaagccgtttcagtgggcagtggcagcgg actgactataacctcacaatttcgtctctccagc cggaagatttcgcctcttactattgtcagcaata ttacaagttccctttcaccttcggtcagggcact aaagtagaatcaaa
SEQ ID NO: 25	gL4 Secuencia Variable ligera con secuencia que codifica el péptido señal subrayada	<u>atgaaaagacagctatcgcaattgcagtgccct</u> <u>tggctgggtttcgctaccgtagcgcaagctgatat</u> ccagatgaccagagtccaagcagtctctccgcc agcgtaggcgatcgtgtgactattacctgtcgtg ccagtgaggacctctattacaacctggcctggta tcagcgtaaaccgggcaaagccccgaagctgctc atctatgatacgtaccgctggctgacgggtgtgc caagccgtttcagtgggcagtggcagcggtaactga ctataacctcacaatttcgtctctccagccggaa gatttcgcctcttactattgtcagcaatattaca agttccctttcaccttcggtcagggcactaaagt agaaatcaaa

FIGURA 7: Secuencias 342

Número de ID de secuencia	Descripción	Secuencia
SEQ ID NO: 15	cadena ligera 342gL4 (incluyendo región constante)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASEDLYYNLAWYQ RKPGKAPKLLIYDTRADGVPSRFSGSGSGTDYTLT ISLQPEDFASYYCQYYKFPFTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 18	cadena ligera 342gL4 (incluyendo región constante)	atgaaaaagacagctatcgcaattgcagtgcccttggctg gtttcgtaccgtagcgcaagctgatatccagatgaccca gagccaagcagctctctccgccagcgtaggcgatcgtgtg actattacctgtcgtgccagtgaggacctctattacaacc tggcctggtatcagcgtaaaccgggcaaacccccgaagct gctcatctatgatacgtaccgcctggctgacgggtgtgcca agccgtttcagtgccagtgccagcgggactgactataccc tcacaatttcgtctctccagccggaagatttcgectctta ctattgtcagcaatattacaagttccctttcaccttcggt cagggcactaaagtagaaatcaaacgtacggtagcggccc catctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaa atctggaactgcctctgttgtgtgectgctgaataacttc tatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacg ccctccaatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagca ggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctg acgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacg cctgcaagtcacccatcagggcctgagctcaccagtaac aaaaagttttaatagaggggagtg
SEQ ID NO: 12	cadena pesada 342gH1 Fab (sin bisagra) (incluyendo región constante)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSSTNYHVVHWV RQAPGKGLEWGMVIGDGDTSYNSVLKSRFTISRDT KNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLTHYYVLAAWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC

FIGURA 7 continuación

Número de ID de secuencia	Descripción	Secuencia
SEQ ID NO: 26 (SEQ ID NO: 23 sin secuencia señal)	cadena pesada 342gH1 Fab (sin bisagra) (incluyendo región constante)	<p><u>atgaagaagactgctatagcaattgcagtgccgctagctggt</u> <u>ttcgccaccgtggcgcaagctgaggttcagctggtcgagctc</u> ggaggcgggcttgtccagcctggtgggagcctgcgtctctct tgtgcagtgagcggcttcagctctaccaattaccatgtgcac tgggtgcgtcaggcacctgggaagggcctggagtggatgggt gttatttggggcgacggcgatacatcctacaactccgtcctg aagagccgtttcaccatttcccgtgacacctcaaagaatacc gtttacctccagatgaactctctccgcgcagaggacacagca gtctattactgtgcacgtcaactgacctattacgttttg gcagcctggggcaagggactctggtcacagctctcgagcgt tctacaaagggcccatcggctcttccccctggcaccctcctcc aagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtc aaggactacttccccgaaccggtgacgggtgctggaactca ggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtccta cagtcctcaggactctactcctcagcagcgtggtgaccgtg cctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaacgtg aatcacaagcccagcaacaccaaggtcgacaagaaagttag cccaaatcttgt</p>
SEQ ID NO: 13	cadena pesada 342gH1 Fab' (incluyendo región constante)	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSSSTNYHVHWVRQ APGKGLEWMGVIWGDGDTSYNSVLKSRFTISRDTSKNTV YLQMNSLRAEDTAVYYCARQLTHYYVLAAWGQGLVTVS SASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCAA</p>
SEQ ID NO: 27 (SEQ ID NO: 24 sin secuencia señal)	cadena pesada 342gH1 Fab' (incluyendo región constante)	<p><u>atgaagaagactgctatagcaattgcagtgccgctagctggt</u> <u>ttcgccaccgtggcgcaagctgaggttcagctggtcgagctc</u> ggaggcgggcttgtccagcctggtgggagcctgcgtctctct tgtgcagtgagcggcttcagctctaccaattaccatgtgcac tgggtgcgtcaggcacctgggaagggcctggagtggatgggt gttatttggggcgacggcgatacatcctacaactccgtcctg aagagccgtttcaccatttcccgtgacacctcaaagaatacc gtttacctccagatgaactctctccgcgcagaggacacagca gtctattactgtgcacgtcaactgacctattacgttttg gcagcctggggcaagggactctggtcacagctctcgagcgt tctacaaagggcccatcggctcttccccctggcaccctcctcc aagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtc aaggactacttccccgaaccggtgacgggtgctggaactca ggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtccta cagtcctcaggactctactcctcagcagcgtggtgaccgtg cctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaacgtg aatcacaagcccagcaacaccaaggtcgacaagaaagttag cccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcgccgcg</p>

FIGURA 8

SEQ ID NO: 28: secuencia de ADN de vector 342gL4gH1 **Fab** (sin bisagra)

```

1  atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggctg gtttcgctac
51 cgtagcgc gctGATATCc agatgaccca gagtccaagc agtctctccg
101 ccagcgtagg cgatcgtgtg actattacct gtcgtgccag tgaggacctc
151 tattacaacc tggcctggta tcagcgtaaa ccgggcaaag ccccgaagct
201 gctcatctat gatacgtacc gcctggctga cgggtgtcca agccgtttca
251 gtggcagtgg cagcgggtact gactataccc tcacaatttc gtctctccag
301 ccggaagatt tcgcctctta ctattgtcag caatattaca agttcccttt
351 caccttcggt cagggcacta aagtagaaat caaaCGTACG gtagcggccc
401 catctgtctt catcttcccg ccatctgatg agcagttgaa atctggaact
451 gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc tatcccagag aggccaaagt
501 acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc caggagagtg
551 tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg
601 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt
651 caccatcag ggctgagct caccagtaac aaaaagtttt aatagagggg
701 agtggttaaaa tgaagaagac tgctatagca attgcagtgg cgctagctgg
751 tttcgccacc gtggcgcaag ctgaggttCA GCTGgtcgag tctggaggcg
801 ggcttgtcca gcctgggtggg agcctgcgctc tctcttgtgc agtgagcggc
851 ttcagctcta ccaattacca tgtgcaactgg gtgcgctcagg cacctgggaa
901 gggcctggag tggatgggtg ttatttgggg cgacggcgat acatcctaca
951 actccgtcct gaagagccgt ttcaccattt cccgtgacac ctcaaagaat
1001 accgtttacc tccagatgaa ctctctccgc gcagaggaca cagcagtcta
1051 ttactgtgca cgteaactga cccactatta cgttttggca gcctggggtc
1101 aagggactct ggtcacagtC TCGAGcgctt ctacaaaggg cccatcggtc
1151 ttccccctgg caccctctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct
1201 gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga
1251 actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag
1301 tctcaggac tctactcct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag
1351 cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca
1401 ccaaggtcga caagaaagt gagcccaaat cttgttaa

```

FIGURA 8 continuación

SEQ ID NO: 41: secuencia de ADN de vector 342gL4gH1 Fab'

```

1  atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggctg gtttcgctac
51  cgtagcgcaa gctGATATCc agatgacca gagtccaagc agtctctccg
101 ccagcgtagg cgatcgtgtg actattacct gtcgtgccag tgaggacctc
151 tattacaacc tggcctggta tcagcgtaaa ccgggcaaag ccccgaagct
201 gctcatctat gatacgtacc gcctggctga cgggtgtgcca agccgtttca
251 gtggcagtgg cagcggctact gactataccc tcacaatttc gtctctccag
301 ccggaagatt tcgcctctta ctattgtcag caatattaca agttcccttt
351 caccttcggt cagggcacta aagtagaaat caaaCGTACG gtageggccc
401 catctgtctt catcttcccg ccatctgatg agcagttgaa atctggaact
451 gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc tatcccagag aggccaaagt
501 acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc caggagagtg
551 tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg
601 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt
651 cacccatcag ggcctgagct caccagtaac aaaaagtttt aatagagggg
701 agtggtaaaa tgaagaagac tgctatagca attgcagtggt cgctagctgg
751 tttcgccacc gtggcgcaag ctgaggttCA GCTGgtcgag tctggaggcg
801 ggcttgtcca gcctggtggg agcctgcgtc tctcttgtgc agtgagcggc
851 ttcagctcta ccaattacca tgtgactggg gtgcgtcagg cacctgggaa
901 gggcctggag tggatgggtg ttatttgggg cgacggcgat acatcctaca
951 actccgtcct gaagagccgt ttcaccattt cccgtgacac ctcaaagaat
1001 accgtttacc tccagatgaa ctctctccgc gcagaggaca cagcagtcta
1051 ttactgtgca cgtcaactga cccactatta cgttttggca gcctggggtc
1101 aagggactct ggtcacagtC TCGAGcgctt ctacaaaggg cccatcggtc
1151 ttccccctgg caccctcctc caagagcacc tctgggggca cageggccct
1201 gggctgacct gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga
1251 actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag
1301 tcctcaggac tctactcctt cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag
1351 cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca
1401 ccaaggtcga caagaaagt gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca
1451 tgcgccgcg

```

FIGURA 9

CADENA LIGERA Injertos 342
 1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105
 Ligera 342 DIQMTQSPASLSASLGETVTECRASEDLIYNLAWYQKPGNSPQLLIYDTYRLADGVPSRFSGGSGTQYSLKINTLPSGDVAVFCQOYKFKFPFFGSGTKLELK
 2 1 1 012 DIQMTQSPSLSASVGDRVTIITCRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGGSGTDFLLTISLQPEDFATYYCQOYSYTFWTFGQGTKVEIK
 VK1 gL3 DIQMTQSPSLSASVGDRVTIITCRASEDLIYNLAWYQKPGKAPKLLIYDTYRLADGVPSRFSGGSGTDFLLTISLQPEDFATYYCQOYKFKFPFFGSGTKVEIK
 VK1 gL4 DIQMTQSPSLSASVGDRVTIITCRASEDLIYNLAWYQKPGKAPKLLIYDTYRLADGVPSRFSGGSGTDFLLTISLQPEDFATYYCQOYKFKFPFFGSGTKVEIK
 CADENA PESADA VH3 Injertos 342
 1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 abc 85 90 95 105 110
 Pesada 342 QVQLKESGPGLVQPSETLSLTCTVSGFSSTNYHVHWVRQPPGKSLWGMVWGDGDTSYNSVLKSRLSITRDTSRSQVFLKMSSLOQTEDTATYYCARQLTHYYVLAAWGQGSVTVS
 1 -1, 3 -66 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWVSVIYSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLLQMNLSLRAEDTAVYYCAR YFDYWGQGTLVTVS
 VH3 9H7 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSSTNYHVHWVRQAPGKGLEWVSVIYSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLLQMNLSLRAEDTAVYYCARQLTHYYVLAAWGQGTLVTVS
 VH3 9H1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSSTNYHVHWVRQAPGKGLEWVSVIYSGGSTYYADSVKGRFTISRDTISKNTVYLQMNLSLRAEDTAVYYCARQLTHYYVLAAWGQGTLVTVS
 CADENA PESADA VH4 Injertos 342
 1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 abc 85 90 95 105 110
 Pesada 342 QVQLKESGPGLVQPSETLSLTCTVSGFSSTNYHVHWVRQPPGKSLWGMVWGDGDTSYNSVLKSRLSITRDTSRSQVFLKMSSLOQTEDTATYYCARQLTHYYVLAAWGQGSVTVS
 1 -1 4 -59 QVQLQESGPGLVKVPSETLSLTCTVSGGSISSYYNWSWIRQPPGKGLEWIGIYIYSSGNTNYPFLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSTVAADTAVYYCAR YFDYWGQGTLVTVS
 VH4 9H6 EVQLQESGPGLVKVPSETLSLTCTVSGFSSTNYHVHWIRQPPGKGLEWIGIYIYSSGNTNYPFLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSTVAADTAVYYCARQLTHYYVLAAWGQGTLVTVS
 VH4 9H1 EVQLQESGPGLVKVPSETLSLTCTVSGFSSTNYHVHWIRQPPGKGLEWIGIYIYSSGNTNYPFLKSRVTISRDTISKNTVYLQMNLSLRAEDTAVYYCARQLTHYYVLAAWGQGTLVTVS

FIGURA 10: Anticuerpo 381 anti-CD154

Secuencia V_L

SEQ ID NO: 54 (la secuencia subrayada es una secuencia CDR)
 DIQMTQSPTS LSASLGETVS IECLAGEDIS NVLAWYQQKS GGSPQLLIYA
ANRLQDGVPS RFSGSGSGTR YSLKISGMRP EDEADYFCQQ TFRYPLTFGS
 GTKLELK

SEQ ID NO: 55

GACATCCAGA TGACACAGTC TCCAACCTCC CTGTCTGCAT CTCTCGGAGA
 AACTGTCTCC ATCGAATGTC TAGCAGGTGA AGACATTTCC AATGTTTTAG
 CGTGGTATCA GCAGAAGTCA GGGGGGTCTC CTCAGCTCCT GATCTATGCT
 GCAAATAGGT TACAAGACGG GGTCCCCTCA CGGTTTCAGTG GCAGTGGATC
 TGGCACACGG TATTCTCTCA AGATCAGTGG CATGCGACCT GAAGATGAAG
 CAGATTATTT CTGTCAACAG ACTTTCAGGT ATCCGCTCAC GTTCGGTTCT
 GGGACCAAGC TGAATTGAA A

Secuencia V_H

SEQ ID NO: 56 (la secuencia subrayada es una secuencia CDR)
 EVPLVESGGG LVQPGRSMKL SCVASGFTFS DYYMAWVRQA PKKGLEWVAS
ISYEGSSTYY GDSVKGRFTV SRDIAKSTLY LQMHS�KSED TAIYYCARHD
DSPGYFFDYW GQGVMTVS

SEQ ID NO: 57

GAGGTGCCGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTAGTGCAGC CTGGAAGGTC
 CATGAAACTT TCCTGTGTAG CCTCAGGATT CACTTTCAGT GACTATTACA
 TGGCCTGGGT CCGCCAGGCT CCAAAGAAGG GTCTGGAGTG GGTCGCATCC
 ATTAGTTATG AGGGTAGTAG TACTTACTAT GGAGACTCCG TGAAGGGCCG
 ATTCACTGTC TCCAGAGATA TTGCAAAAAG CACCCTATAC CTTCAAATGC
 ACAGTCTGAA GTCTGAGGAT ACGGCCATTT ATTATTGTGC ACGACATGAC
 GATAGTCCAG GATACTACTT TGATTATTGG GGCCAAGGAG TCATGGTCAC
 AGTCTCG

FIGURA 11: Anticuerpo 338 anti-CD154

Secuencia V_L

SEQ ID NO: 58 (la secuencia subrayada es una secuencia CDR)

DIQMTQSPAS LSASLGETVT IECRTSEDIY SNLAWYRQRP GKSPQLLIYD
TNRLADGVPS RFSGSGSGTQ YSLKINSLQS EDVASYFCQH YSNFPWTFGG
 DTKLELK

SEQ ID NO: 59

GACATCCAGA TGACACAGTC TCCGGCTTCC CTGTCTGCAT CTCTGGGAGA
 AACTGTCACC ATCGAATGTC GAACAAGTGA GGACATTTAC AGTAATTTAG
 CGTGGTATCG GCAGAGACCA GGAAGTCTC CTCAGCTCCT GATCTATGAT
 ACAAATAGAT TGGCTGATGG GGTCCCCTCA CGGTTCAGTG GCAGTGGATC
 TGGCACACAA TATTCTCTAA AGATAAACAG CCTGCAATCT GAAGATGTCG
 CCAGCTATTT CTGTCAACAC TATAGCAATT TTCCGTGGAC CTTCGGTGGA
 GACACCAAGC TGAATTGAA A

Secuencia V_H

SEQ ID NO: 60 (la secuencia subrayada es una secuencia CDR)

QVQLTESGPG LVQPSQTL~~SL~~ TCTVSGFSLT SHHISWVRQP PGKGLEWVGV
MWNDGGTLYN SALKSRPSIS RDTSKSQVFL KMSSLQTEDT ATYYCARGKM
HYYVLDAWGQ GASVTVS

SEQ ID NO: 61

CAGGTGCAGC TGACGGAGTC AGGGCCTGGC CTGGTGCAGC CCTCACAGAC
 CCTGTCTCTC ACCTGCACTG TCTCTGGGTT CTCATTAACC AGCCATCATA
 TATCCTGGGT TCGACAGCCT CCAGAAAAG GTCTGGAGTG GGTGGGAGTC
 ATGTGGAATG ATGGAGGCAC ATTATATAAT TCAGCTCTCA AGTCTCGACC
 GAGCATCAGT AGGGACACCT CCAAGAGTCA GGTCTTCTTA AAAATGAGCA
 GTCTGCAAAC TGAAGACACA GCCACTTACT ACTGTGCCAG GGCAAAATG
 CATTACTATG TTCTGGATGC CTGGGGTCAA GGAGCTTCAG TCACTGTCTC
 G

FIGURA 12
Anticuerpos anti-CD154 humano (CD40L)
(Fab' quimérico)

Anticuerpo	Kd Biacore (pM)	IC50 de Unión a CD40 (ng/ml)	IC50 de ICAM-1 Upreg'n (ng/ml)
Hu5c8 (IgG entera)	23	16 (n=6)	43 (n=10)
CA081-00294 (294)	107	26 (n=2)	364 (n=6)
CA081-00295 (295)	51	15 (n=2)	138 (n=6)
CA081-00300 (300)	43	15 (n=2)	113 (n=7)
CA081-00335 (335)	42	-	279 (n=3)
CA081-00303 (303)	130	51 (n=3)	252 (n=3)
CA081-00338 (338)	15	6 (n=2)	192 (n=6)
CA081-00342 (342)	16	8 (n=5)	53 (n=6)
CA081-00381 (381)	5	22 (n=2)	100 (n=2)
CA081-00402 (402)	48	12 (n=2)	92 (n=2)

FIGURA 13: cadena ligera kappa hu5c8

SEQ ID NO: 62 (la secuencia subrayada es la secuencia señal)

METDTLLLWV LLLWVPGSTG DIVLTQSPAT LSVSPGERAT ISCRASQRVS
 SSTYSYMHWY QQKPGQPPKL LIKYASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS
 SVEPEDFATY YCQHSWEIPP TFGGGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK
 SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
 STLTLISKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

SEQ ID NO: 63 (proteína madura)

DIVLTQSPAT LSVSPGERAT ISCRASQRVS SSTYSYMHWY QQKPGQPPKL
 LIKYASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SVEPEDFATY YCQHSWEIPP
 TFGGGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
 QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLISKADY EKHKVYACEV
 THQGLSSPVT KSFNRGEC

SEQ ID NO: 64 (marco de lectura abierto)

ATGGAGACAG ACACACTCCT GTTATGGGTG CTGCTGCTCT GGGTTCAGG
 TTCCACTGGT GACATTGTAC TGACACAGTC TCCTGCTACC TTATCTGTAT
 CTCCGGGAGA GAGGGCCACC ATCTCATGCA GGGCCAGCCA ACGTGTCACT
 TCATCTACCT ATAGTTATAT GCACTGGTAC CAACAGAAAC CAGGACAGCC
 ACCCAAACCT CTCATCAAGT ATGCATCCAA CCTAGAATCT GGGGTCCCTG
 CCAGGTTTCAG TGGCAGTGGG TCTGGGACTG ACTTCACCCT CACCATCTCT
 TCTGTGGAGC CGGAGGATTT TGCAACATAT TACTGTCAGC ACAGTTGGGA
 GATTCCTCCG ACGTTCGGTG GAGGGACCAA GCTGGAGATC AAACGAACTG
 TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCC GC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
 TCTGGAACCTG CCTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ATCCAGAGA
 GGCCAAGTA CAGTGGAAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAACCTCC
 AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
 AGCACCTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
 CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCGTCACA AAGAGCTTCA
 ACAGGGGAGA GTGTTAG

FIGURA 14: cadena pesada hu5c8 aglyP-hulgG4

SEQ ID NO: 65 (la secuencia subrayada es la secuencia señal)

MDWTWRVFCL LAVAPGAHSQ VQLVQSGAEV VKPGASVKLS CKASGYIFTS
 YYMYWVKQAP GQGLEWIGEI NPSNGDTNFN EKFKSKATLT VDKSASTAYM
 ELSSLRSED AVYYCTRS DG RNDMDSWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP
 CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY
 SLSSVVTVPS SSLGTKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE
 FLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE
 VHNAKTKPRE EQFN SAYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE
 KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES
 NGQPENNYKT TPPVLDS DGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH
 NHYTQKSLSL SLG

SEQ ID NO: 66 (proteína madura: las mutaciones S228P/T299A están subrayadas y en negrita)

QVQLVQSGAE VVKPGASVKL SCKASGYIFT SYMYWVKQA PGQGLEWIGE
 INPSNGDTNF NEKFKSKATL TVDKSASTAY MELSSLRSED TAVYYCTRS D
 GRNDMDSWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY
 FPPEVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTKTYT
 CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM
 ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFN SAYRV
 VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTL P
 PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDS D
 SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLSL LSLG

SEQ ID NO: 67

ATGGACTGGA CCTGGAGGGT CTTCTGCTTG CTGGCTGTAG CACCAGGTGC
 CCACTCCCAG GTCCAAC TGG TGCAGTCAGG GGCTGAAGTG GTGAAGCCTG
 GGGCTTCAGT GAAGTTGTCC TGCAAGGCTT CTGGCTACAT CTTACACAGT
 TATTATATGT ACTGGGTGAA GCAGGCGCCC GGACAAGGCC TTGAGTGGAT
 TGGAGAGATT AATCCTAGCA ATGGTGATAC TAACTTCAAT GAGAAGTTCA
 AGAGTAAGGC CACACTGACT GTAGACAAAT CCGCCAGCAC AGCATA CATG
 GAGCTCAGCA GCCTGAGGTC TGAGGACACT GCGGTCTATT ACTGTACAAG
 ATCGGACGGT AGAAATGATA TGGACTCCTG GGGCCAAGGG ACCCTGGTCA
 CCGTCTCCTC AGCTTCCACC AAGGGCCCAT CCGTCTTCCC CCTGGCGCCC
 TGCTCCAGAT CTACCTCCGA GAGCACAGCC GCCCTGGGCT GCCTGGTCAA
 GGACTACTTC CCCGAACCGG TGACGGTGTC GTGGA ACTCA GGCGCCCTGA
 CCAGCGGCGT GCACACCTTC CCGGCTGTCC TACAGTCCTC AGGACTCTAC
 TCCCTCAGCA GCGTGGTGAC CGTGCCCTCC AGCAGCTTGG GCACGAAGAC
 CTACACCTGC AACGTAGATC ACAAGCCCAG CAACACCAAG GTGGACAAGA
 GAGTTGAGTC CAAATATGGT CCCCCATGCC CACCGTGCCC AGCACCTGAG
 TTCCTGGGGG GACCATCAGT CTTCTGTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC
 TCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTCAC GTGCGTGGTG GTGGACGTGA
 GCCAGGAAGA CCCCAGGTC CAGTTCAACT GGTACGTGGA TGGCGTGGAG

FIGURA 14 continuación

GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTTCA ACAGCGCGTA
CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCCTGCA CCAGGACTGG CTGAACGGCA
AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG GCCTCCCGTC CTCCATCGAG
AAAACCATCT CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAGCCAC AAGTGTACAC
CCTGCCCCCA TCCCAGGAGG AGATGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT
GCCTGGTCAA AGGCTTCTAC CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC
AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC ACGCCTCCCG TCCTCGATTC
CGACGGCTCC TTCTTCCTCT ACAGCAGGCT AACCGTGGAC AAGAGCAGGT
GGCAGGAGGG GAATGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC
AACCACTACA CACAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCTGGGTT GA

FIGURA 15: cadena ligera kappa hu342

SEQ ID NO: 68 (la secuencia subrayada es la secuencia señal)

MDMRVPAQLL GLLLLWLRGA RCDIQMTQSP SSSLASVGDR VTITCRASED
 LYYNLAWYQR KPGKAPKLLI YDTYRLADGV PSRFSGSGSG TDYTLTISSL
 QPEDFASYC QQYKFPFTF GQGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG
 TASVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSLST
 LTLISKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

SEQ ID NO: 69 (proteína madura)

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASEDLY YNLAWYQRKP GKAPKLLIYD
 TYRLADGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFASYCQQ YKFPFTFGQ
 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
 DNALQSGNSQ ESVTEQDSK STYLSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
 LSSPVTKSFN RQEC

SEQ ID NO: 70 (marco de lectura abierto)

ATGGACATGA GGGTCCCCGC TCAGCTCCTG GGGCTCCTGC TACTCTGGCT
 CCGAGGTGCC AGATGTGATA TCCAGATGAC CCAGAGTCCA AGCAGTCTCT
 CCGCCAGCGT AGGCGATCGT GTGACTATTA CCTGTCTGTC CAGTGAGGAC
 CTCTATTACA ACCTGGCCTG GTATCAGCGT AAACCGGGCA AAGCCCCGAA
 GCTGCTCATC TATGATACGT ACCGCCTGGC TGACGGTGTG CCAAGCCGTT
 TCAGTGGCAG TGGCAGCGGT ACTGACTATA CCCTCACAAT TTCGTCTCTC
 CAGCCGGAAG ATTTTCGCCTC TTACTATTGT CAGCAATATT ACAAGTTCCC
 TTTCACCTC GGTCAGGGCA CTAAAGTAGA AATCAAACGT ACGGTGGCTG
 CACCATCTGT CTTCATCTTC CCGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA
 ACTGCCTCTG TTGTGTGCCT GCTGAATAAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA
 AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCAGGAGA
 GTGTCACAGA GCAGGACAGC AAGGACAGCA CCTACAGCCT CAGCAGCACC
 CTGACGCTGA GCAAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAAGTCT ACGCCTGCGA
 AGTCACCCAT CAGGGCCTGA GCTCGCCCGT CACAAAGAGC TTCAACAGGG
 GAGAGTGTTA G

FIGURA 16: cadena pesada hu342 aglyP-hulgG4

SEQ ID NO: 71 (la secuencia subrayada es la secuencia señal)

MDWTWRVFCL LAVAPGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAVSGFSSTN
 YHVHWVRQAP GKGLEWMGVI WGDGDTSYNS VLKSRFTISR DTSKNTVYLQ
 MN~~SL~~RAEDTA VYYCARQLTH YYVLAAWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP
 CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY
 SLSSVVTVPS SSLGTKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE
 FLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE
 VHNAKTKPRE EQFN~~S~~AYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE
 KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES
 NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH
 NHYTQKSLSL SLG

SEQ ID NO: 72 (proteína madura: las mutaciones S228P/T299A están subrayadas y en negrita)

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGFSST NYHVHWVRQA PGKGLEWMGVI
 IWGDGDTSYN SVLKSRFTIS RDTKNTVYL QMNSLRAEDT AVYYCARQLT
 HYYVLAAWGQ GTLTVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY
 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTKTYT
 CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM
 ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR **EEQFN**SAYRV
 VSVLTVLHQD WLNKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLPP
 PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPVLDSDG
 SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCVMHEAL HNHYTQKSLSL LSLG

SEQ ID NO: 73

ATGGAAGTGA CCTGGAGGGT CTTCTGCTTG CTGGCTGTAG CACCAGGTGC
 CCACTCCGAA GTACAATTGG TCGAGTCTGG AGGCGGGCTT GTCCAGCCTG
 GTGGGAGCCT GCGTCTCTCT TGTGCACTGA GCGGCTTCAG CTCTACCAAT
 TACCATGTGC ACTGGGTGCG TCAGGCACCT GGAAGGGCC TGGAGTGGAT
 GGGTGTATT TGGGGCGACG GCGATACATC CTACAACCTC GTCTGAAGA
 GCCGTTTAC CATTTCCCGT GACACCTCAA AGAATACCGT TTACCTCCAG
 ATGAACTCTC TCCGCGCAGA GGACACAGCA GTCTATTACT GTGCACGTCA
 ACTGACCAC TATTACGTTT TGGCAGCCTG GGGTCAAGGG ACTCTGGTCA
 CAGTCTCGAG CGCTTCAACC AAGGGCCCAT CCGTCTTCCC CCTGGCGCCC
 TGCTCCAGAT CTACCTCCGA GAGCACAGCC GCCCTGGGCT GCCTGGTCAA
 GGACTACTTC CCCGAACCGG TGACGGTGTC GTGGAACTCA GGCGCCCTGA
 CCAGCGGCGT GCACACCTTC CCGGCTGTCC TACAGTCCTC AGGACTCTAC
 TCCCTCAGCA GCGTGGTGAC CGTGCCCTCC AGCAGCTTGG GCACGAAGAC
 CTACACCTGC AACGTAGATC ACAAGCCAG CAACACCAAG GTGGACAAGA
 GAGTTGAGTC CAAATATGGT CCCCCATGCC CACCGTGCCC AGCACCTGAG
 TTCCTGGGGG GACCATCAGT CTTCTGTTC CCCCCAAAC CCAAGGACAC
 TCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTCAC GTGCGTGGTG GTGGACGTGA

FIGURA 16 continuación

GCCAGGAAGA CCCCAGGTC CAGTTCAACT GGTACGTGGA TGGCGTGGAG
GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTTCA ACAGCGCGTA
CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCCTGCA CCAGGACTGG CTGAACGGCA
AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG GCCTCCCGTC CTCCATCGAG
AAAACCATCT CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAGCCAC AAGTGTACAC
CCTGCCCCCA TCCCAGGAGG AGATGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT
GCCTGGTCAA AGGCTTCTAC CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC
AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC ACGCCTCCCG TCCTCGATTC
CGACGGCTCC TTCTTCCTCT ACAGCAGGCT AACCGTGGAC AAGAGCAGGT
GGCAGGAGGG GAATGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC
AACCACTACA CACAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCTGGGTT GA

FIGURA 17

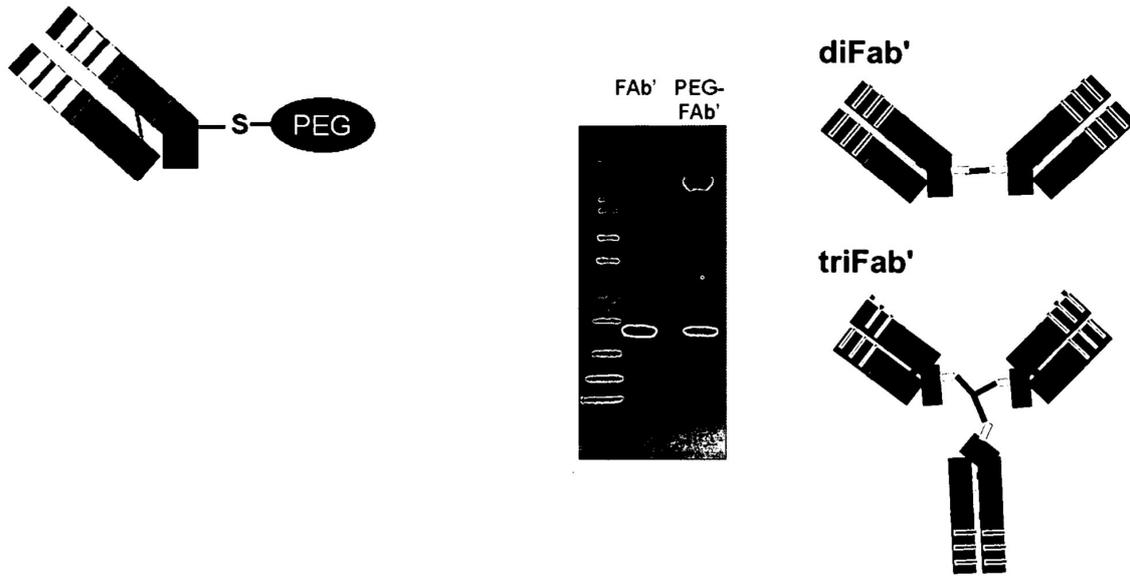


FIGURA 18

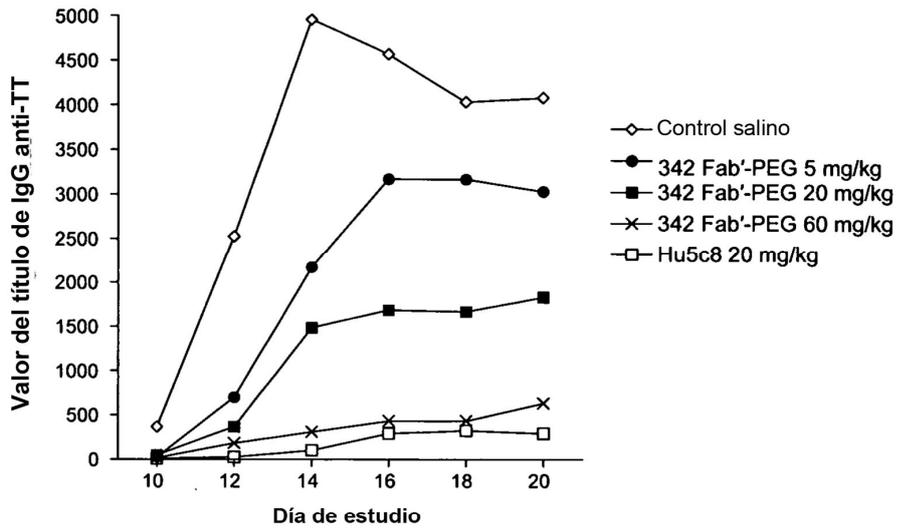
Perfil de actividad de Entidades Fab' & Fab'-PEG 342

342 = injerto gL4gH1

	Kd Biacore (pM)	IC50 de Unión a CD40 (ng/ml)	IC50 de ICAM-1 Up reg'n (ng/ml)	IC50 del Ensayo de unión de competición (pM)
hu5c8 IgG1	25	31	37	54
342 Fab'	28	12	40	24
342 Fab'-PEG	50	35	127	113
342 Di-Fab'	nd	9	22	nd
342 Di-Fab'-PEG	45	32	58	26
342 Tri-Fab'	nd	9	31	nd
342 Tri-Fab'-PEG	nd	8	36	nd
342 aglicosilo IgG4	nd	25	48	35

FIGURA 19: Inhibición de la respuesta inmune IgG al Toxoide tetánico en monos Cynomolgus

Respuesta inmune primaria a TT



Respuesta inmune a TT los Días 30-50

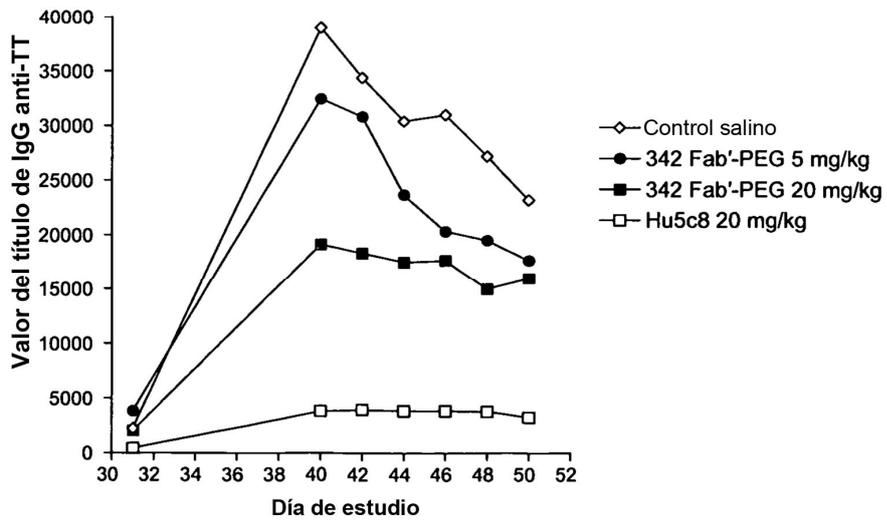


FIGURA 20: Inhibición de la respuesta inmune IgG al Toxoide tetánico en monos Cynomolgus

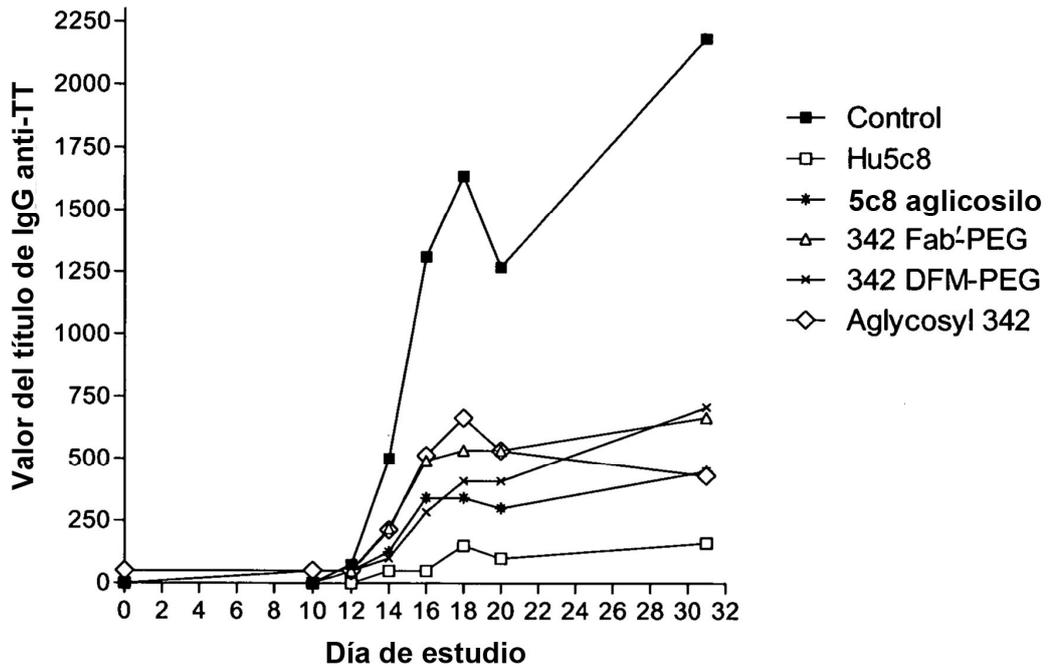


FIGURA 21: Respuesta inmune primaria IgM al Toxoide tetánico en monos Cynomolgus

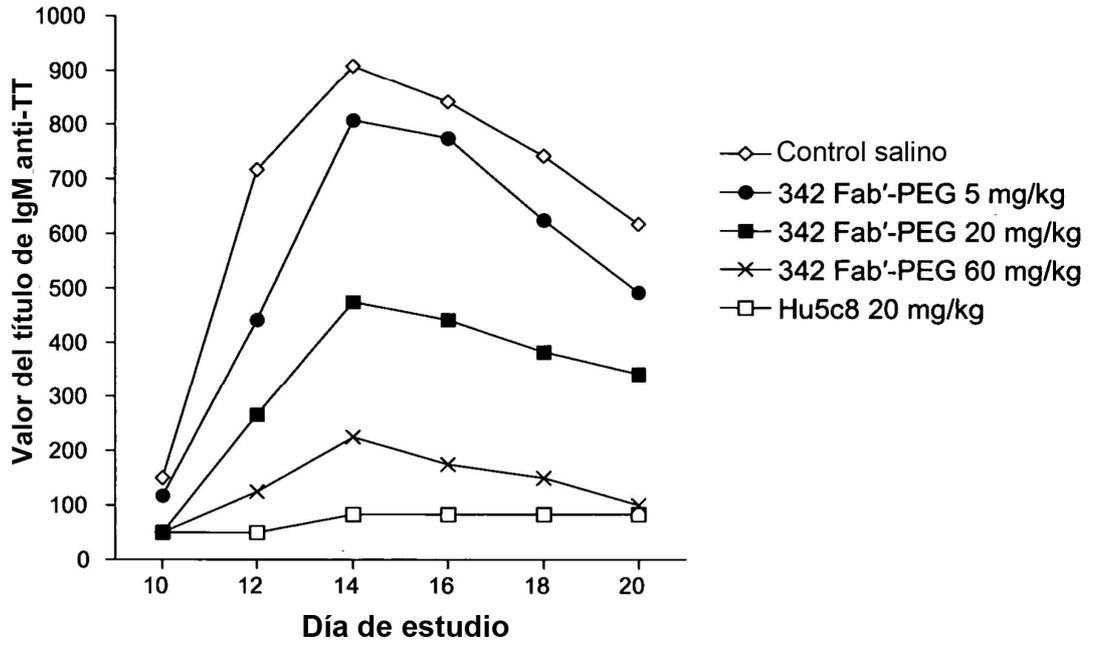


FIGURA 22: Farmacocinética de Fab'-PEG 342 en monos Cynomolgus

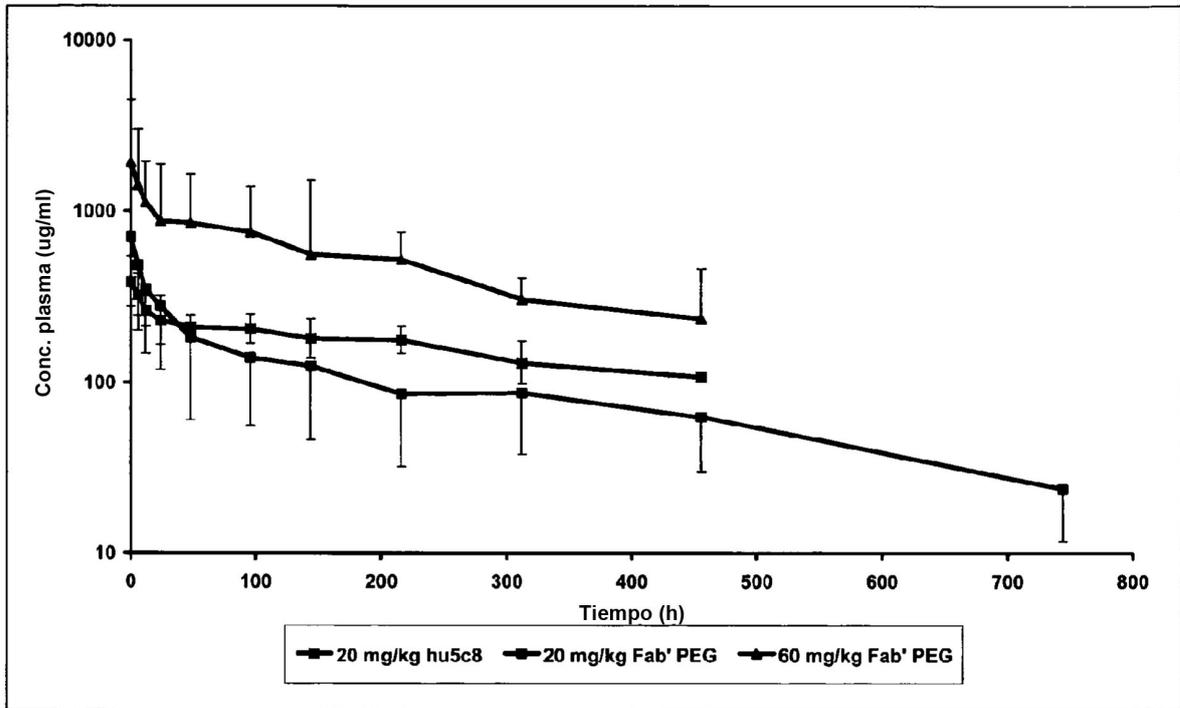


FIGURA 23

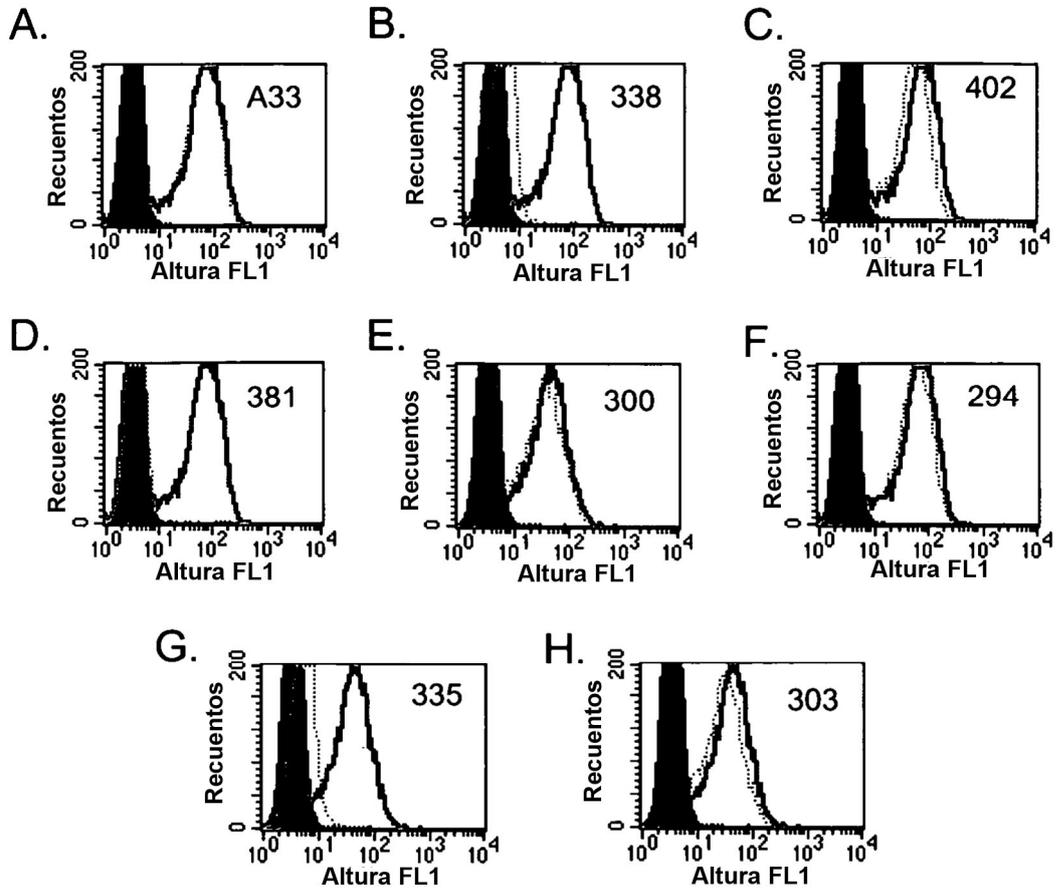


FIGURA 24

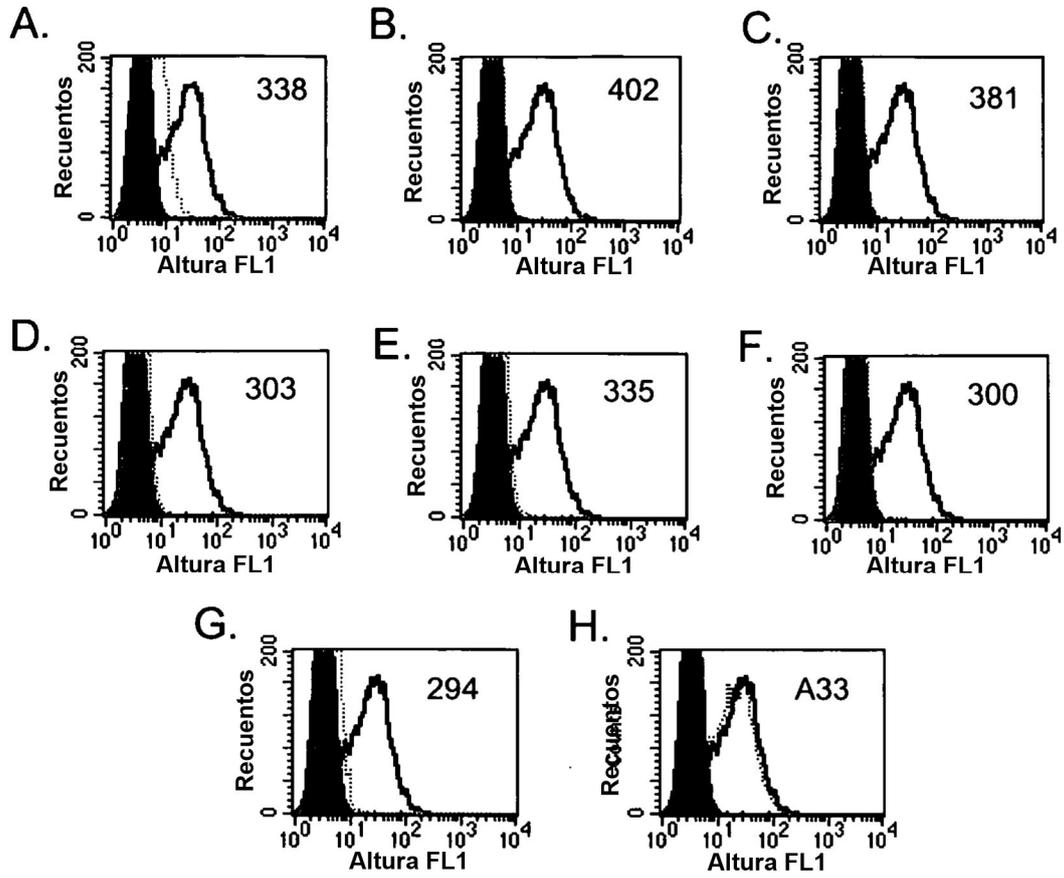
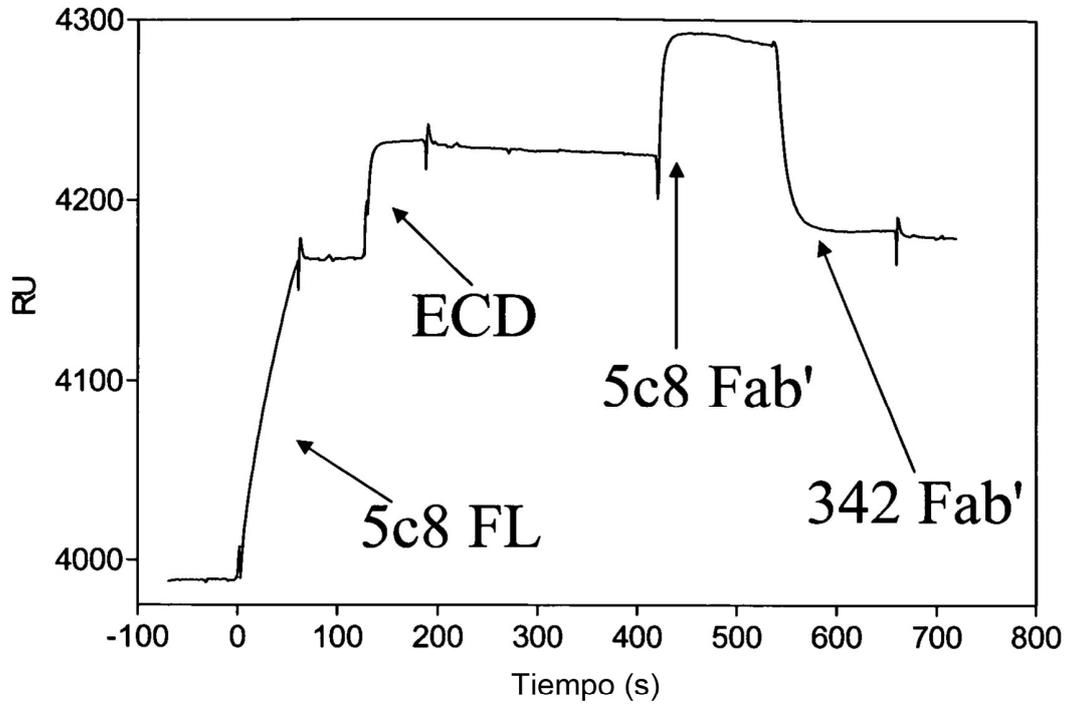


FIGURA 25

A.



B.

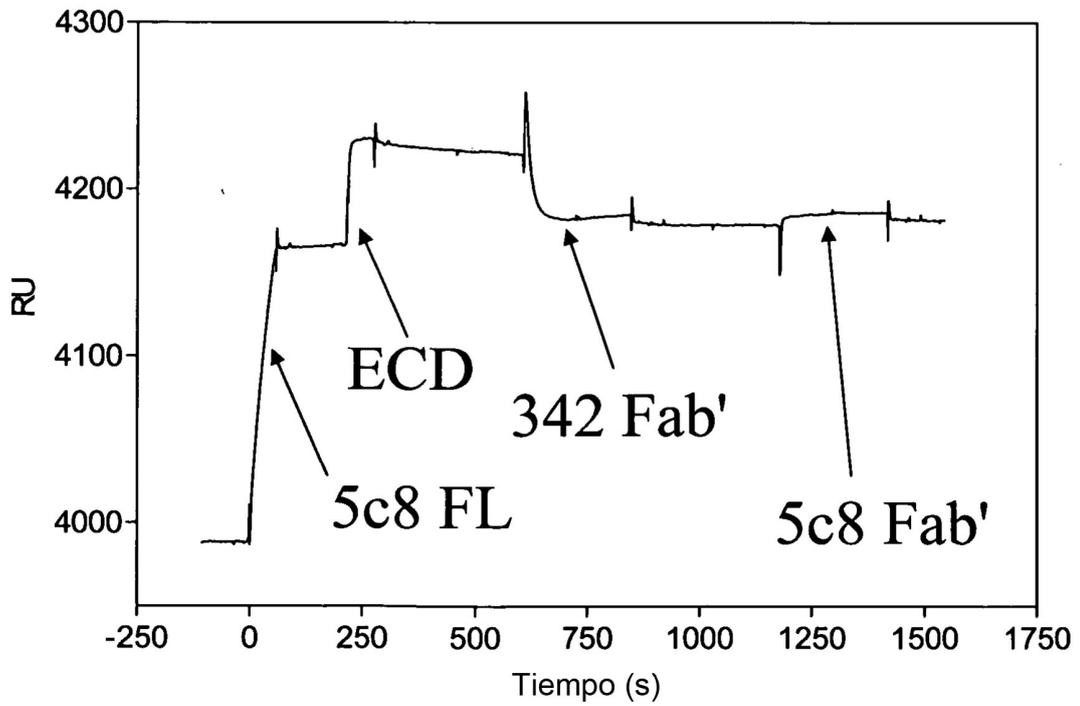


FIGURA 25 continuación

C.

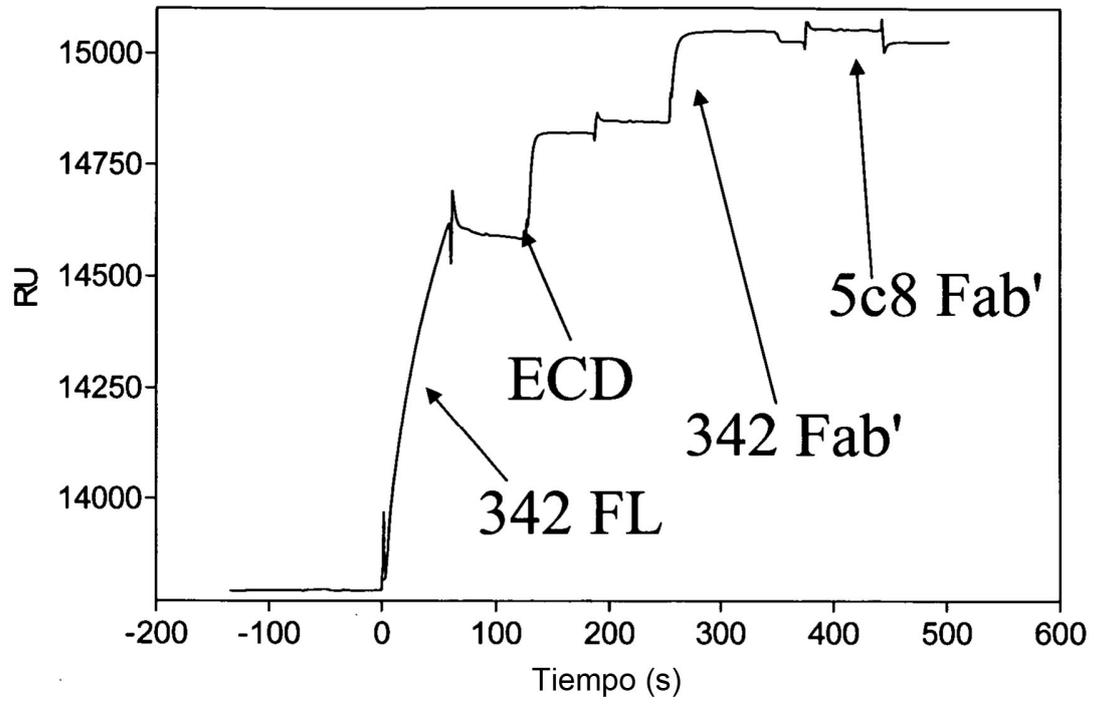
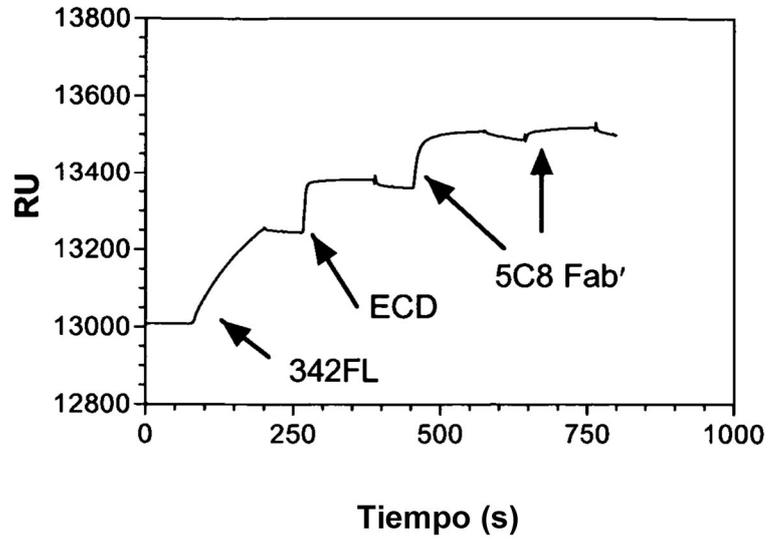
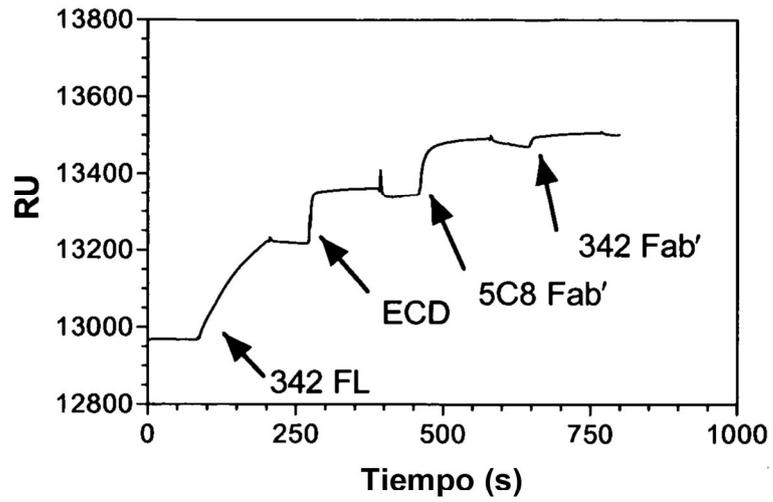


FIGURA 25 continuación

D.



E.



F.

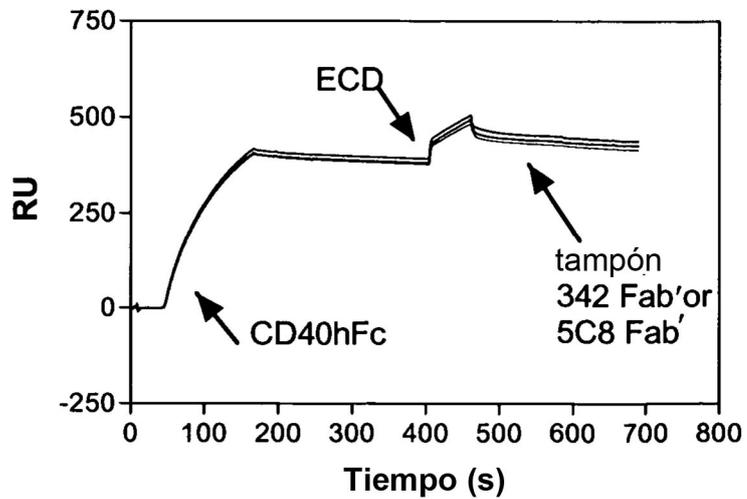


FIGURA 26: Agregación de plaquetas representativa en respuesta a complejos rhsCD40L/anticuerpo (Ensayo 1)

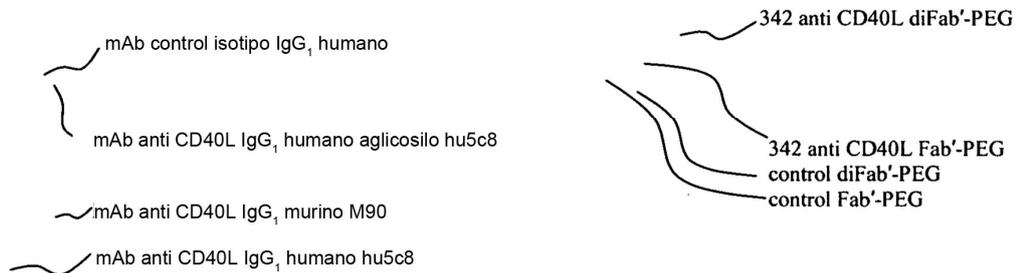
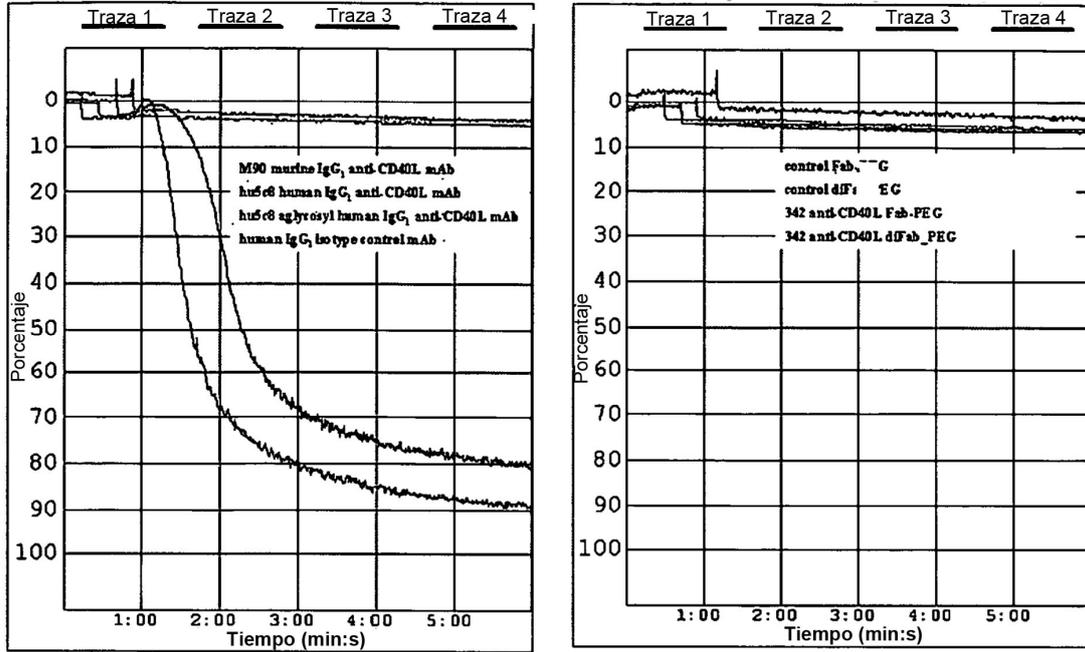


FIGURA 26 continuación

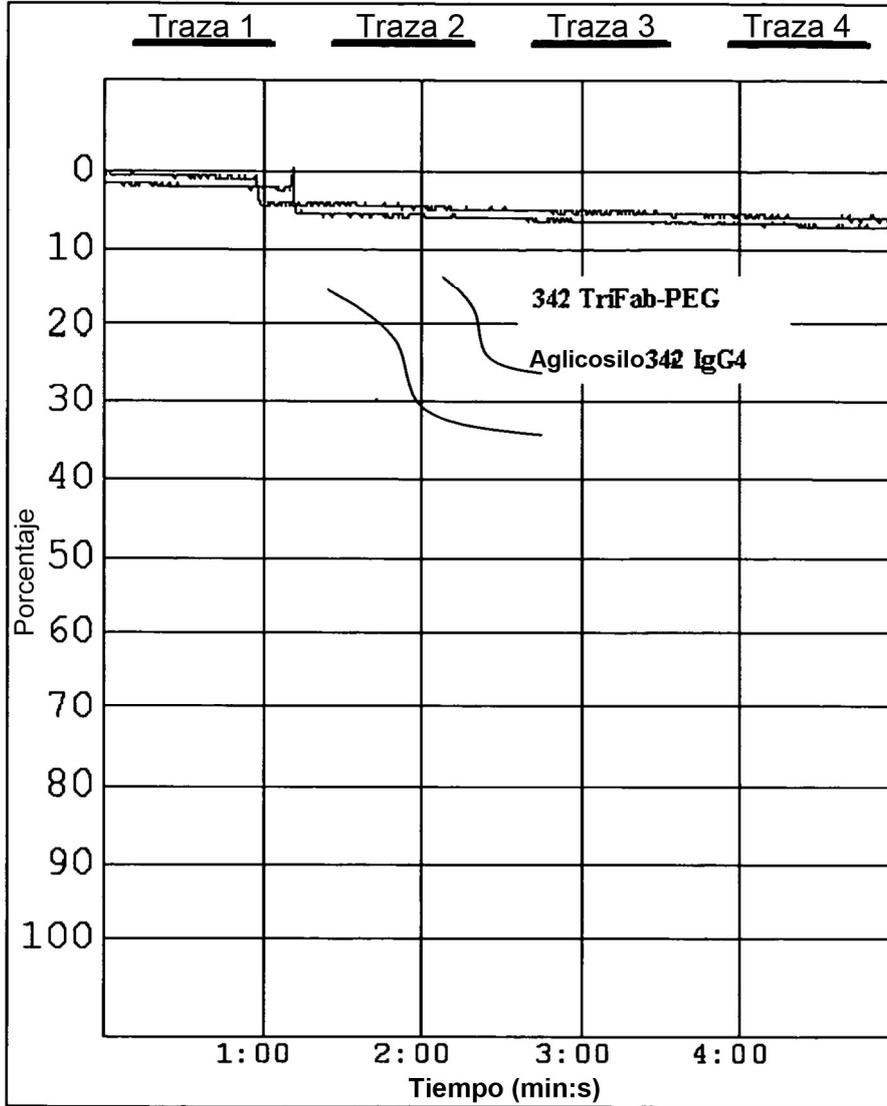


FIGURA 27: Agregación de plaquetas representativa en respuesta a control y anticuerpos anti-CD154 (Ensayo 2)

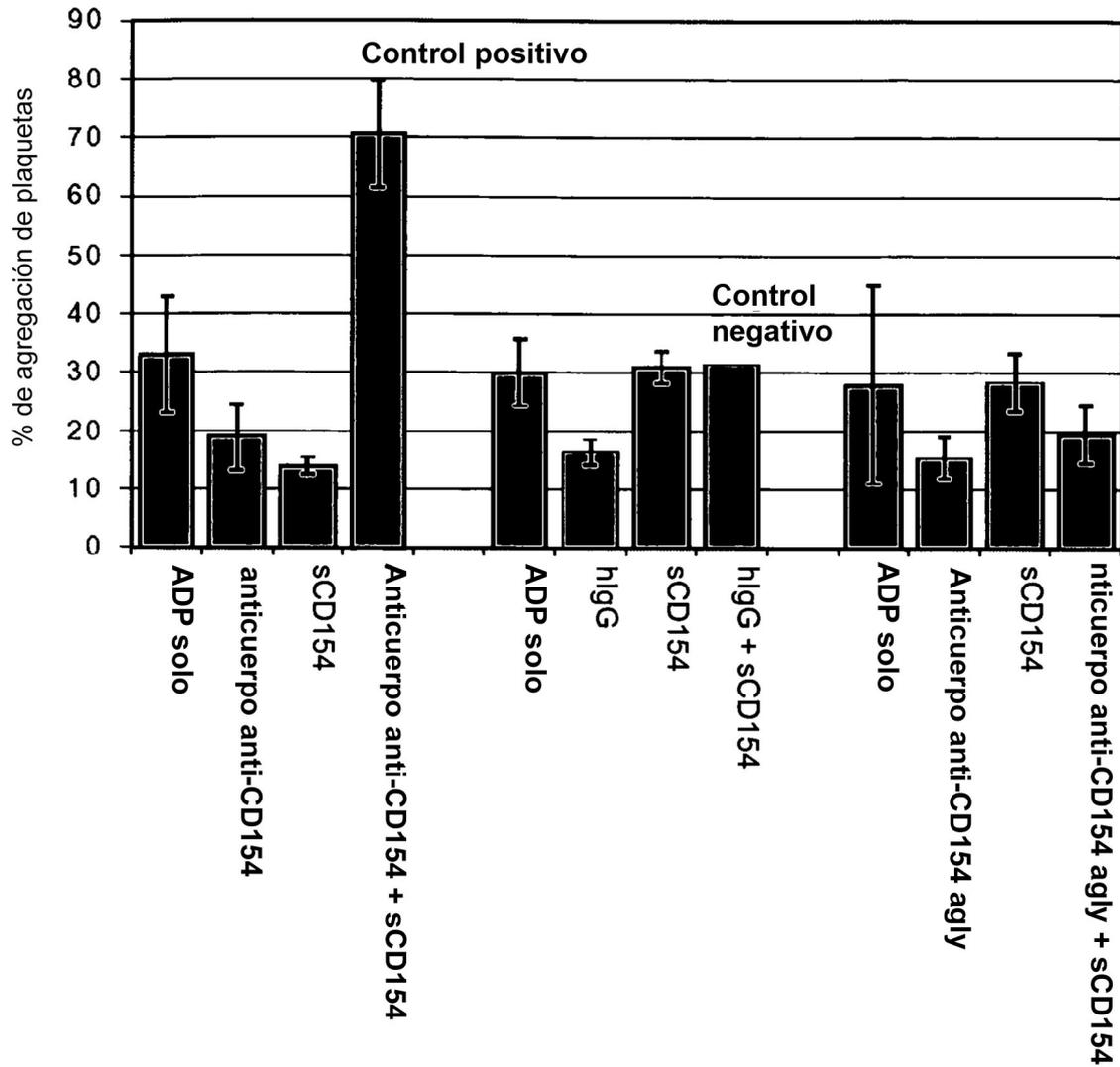


FIGURA 28

	<u>1</u>		<u>3</u>	<u>1</u>				
CD40L_Humano_Soluble	GDQNPQIA	AHWISEASSK	TTSVLQWAEK	GYTMSNNLV	TLENGKQLTV			
CD40L_Ratón_Soluble	GDEDPQIA	AHVSEANSN	AASVLQWAKK	GYTMKSNLV	MLENGKQLTV			
	5		2	6		<u>6</u>	<u>5</u>	6
CD40L_Humano_Soluble	KRQGLYYIYA	QVTFCSNREA	SSQAPFIASL	CLKSPGRFER	ILLRAANTHS			
CD40L_Ratón_Soluble	KREGLYVYVT	QVTFCSNREP	SSQRPFIVGL	WLKPSSGSER	ILLKAANTHS			
	<u>2</u>		5	<u>3</u>	<u>4</u>			
CD40L_Humano_Soluble	SAKPCGQCSI	HLGGVFELQP	GASVFNVTD	PSQVSHGTGF	TSPGLLKL			
CD40L_Ratón_Soluble	SSQLCEQQSV	HLGGVFELQA	GASVFNVTE	ASQVIHRVGF	SSPGLLKL			

FIGURA 29

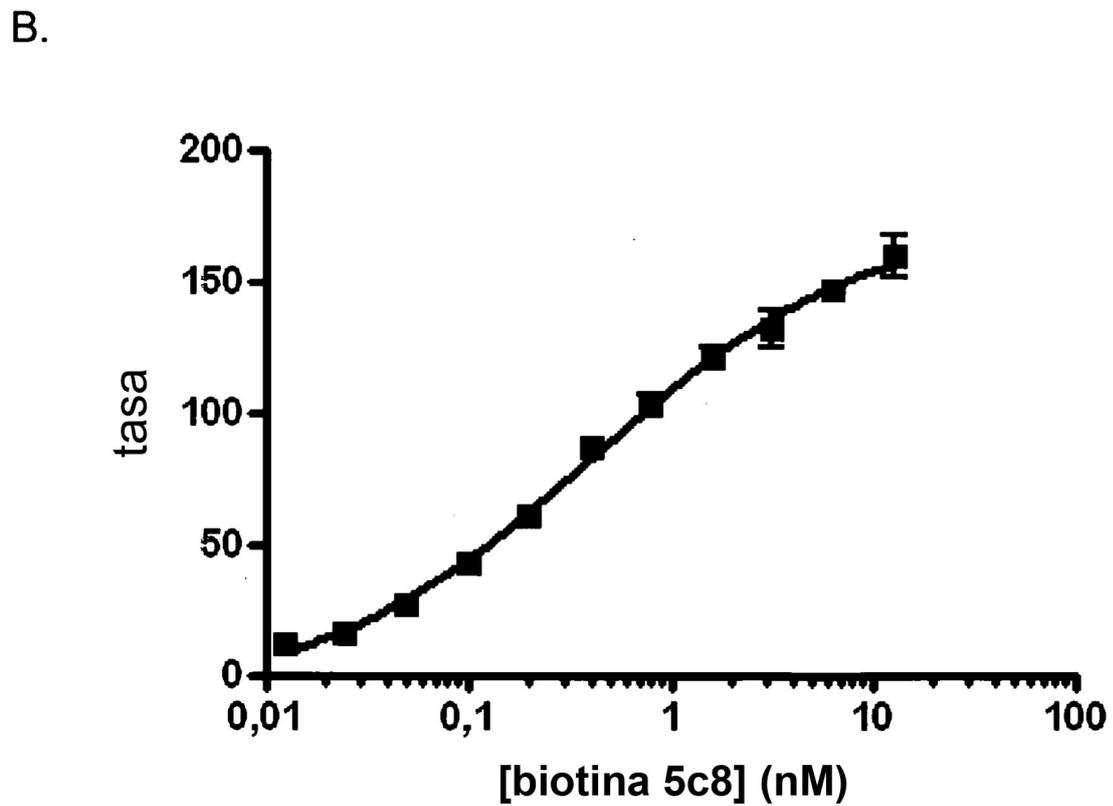
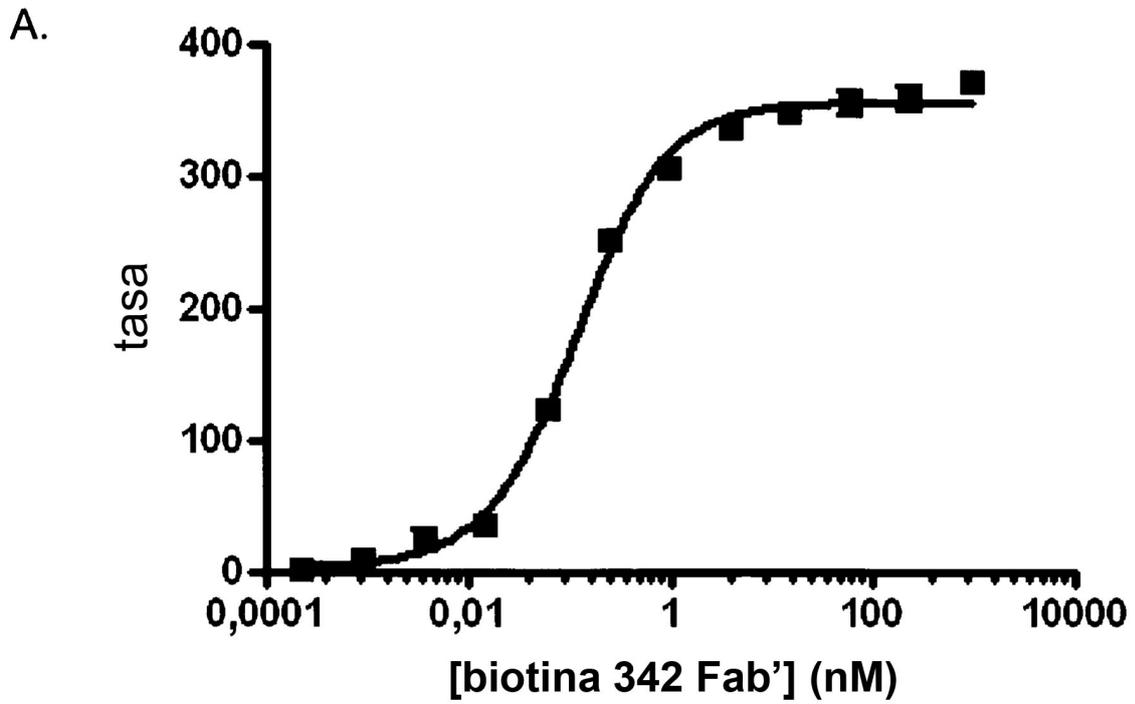
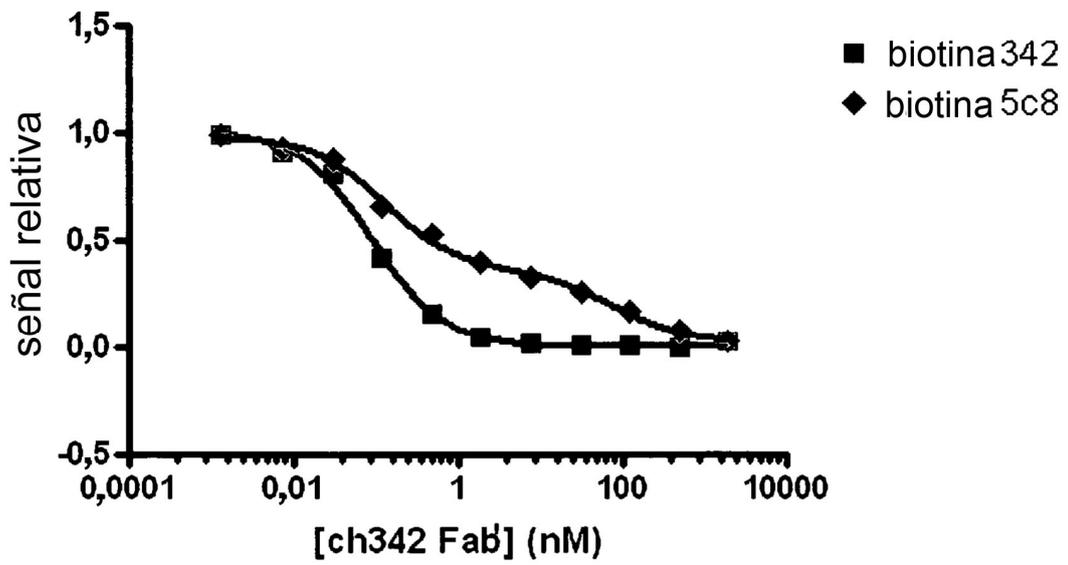


FIGURA 29 continuación

C.



D.

