

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 646**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 38/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2012** **PCT/US2012/028782**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2012** **WO12125569**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2012** **E 12758099 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019** **EP 2683406**

54 Título: **Anticuerpos anti-CD40 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

11.03.2011 US 201161451870 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.12.2019

73 Titular/es:

**BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER,
INC. (50.0%)
330 Brookline Avenue
Boston, MA 02215, US y
EMORY UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**REIMANN, KEITH A.;
WANG, RIJIAN y
LARSEN, CHRISTIAN P.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 2 733 646 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-CD40 y usos de los mismos

5 Antecedentes de la invención

La invención se refiere a anticuerpos anti-CD40 como se especifica en las reivindicaciones y usos de tales anticuerpos, por ejemplo, para reducir la probabilidad o aumentar la duración previa al rechazo del trasplante, para inducir la inmunosupresión o para tratar un trastorno autoinmune.

10

Gilson CR et al. (Anti-CD40 monoclonal antibody synergizes with CTLA4-Ig in promoting long-term graft survival in murine models of transplantation; J. Immunol., 2009;183(3):1625-35) describe dos isoformas del anticuerpo 7E1 anti-ratón CD40 de rata.

15

Boon L. et al. (Preclinical assessment of anti-CD40 Mab 5D12 in cynomolgus monkeys; Toxicology, 2002;174(1):53-65) describe la evaluación preclínica del anticuerpo quimérico anti-CD40 ch5D12.

La supresión del sistema inmune, particularmente el sistema inmune humoral, es beneficioso en el trasplante de órganos y el tratamiento de trastornos autoinmunes. El trasplante de órganos, por ejemplo, se ha convertido en un procedimiento de tratamiento preferido para muchas formas de enfermedades potencialmente mortales que involucran daño a los órganos. El rechazo del trasplante se produce cuando un organismo que recibe células o tejidos trasplantados monta una respuesta inmune no deseada a ese tejido. El rechazo del trasplante se puede minimizar al buscar la compatibilidad del tipo de tejido, pero incluso el tejido compatible generalmente es rechazado por el donante. Por lo tanto, se requieren terapias inmunosupresoras para prácticamente todos los casos de trasplante de tejido.

25

Los mejores resultados en el trasplante clínico se han logrado principalmente mediante el desarrollo de fármacos inmunosupresores no específicos cada vez más potentes para inhibir las respuestas de rechazo. Si bien los resultados a corto plazo han mejorado, los resultados a largo plazo siguen siendo inadecuados. Pueden requerirse agentes inmunosupresores de por vida para combatir el rechazo crónico del órgano trasplantado, y el uso de estos agentes

30

aumenta dramáticamente los riesgos de enfermedades cardiovasculares, infecciones y tumores malignos.

Un objetivo potencial para reducir el rechazo del trasplante es la interacción CD40/CD154. CD40 se expresa en la superficie de los linfocitos B y CD154 se expresa en la superficie de las células T. La interacción entre estas dos proteínas está asociada con la activación de las células B, lo que desencadena la expresión de citoquinas, así como la expresión de marcadores de la superficie celular, incluidos CD23, CD80 y CD86. Se ha demostrado que el bloqueo de esta interacción utilizando anticuerpos anti-CD154 reduce o elimina el rechazo de tejidos trasplantados en primates no humanos.

35

Para cualquier tipo de inmunosupresión (por ejemplo, en un procedimiento de trasplante), un factor clave para su aceptación clínica es lograr un equilibrio entre la eficacia y la toxicidad. Por lo tanto, existe la necesidad de terapias dirigidas específicamente a las vías inmunológicas involucradas en, por ejemplo, rechazo de trasplantes y trastornos autoinmunes.

40

Resumen de la invención

45

La presente invención se refiere a un anticuerpo humanizado aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a CD40 que comprende una región variable de cadena pesada que comprende todas las regiones hipervariables correspondientes a las expuestas en los aminoácidos 20-132 de la SEQ ID NO:2 y una región variable de cadena ligera que comprende todas las regiones hipervariables correspondientes a las expuestas en los aminoácidos 23-128 de la SEQ ID NO:4, donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo bloquea la activación de linfocitos B por células Jurkat que expresan CD154 *in vitro*.

50

Se divulga un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, un anticuerpo que carece de una parte Fc o es una estructura F(ab')₂, un Fab, un Fv o scFv), que se une específicamente a un epítipo presente en CD40 (por ejemplo, CD40 rhesus, murino o humano), donde el epítipo es reconocido por el anticuerpo 2C10 (por ejemplo, donde dicho epítipo no es reconocido por el anticuerpo 3A8 o Chi220, o ambos).

55

El anticuerpo de la invención es capaz de bloquear la activación de linfocitos B (por ejemplo, linfocitos B rhesus o humano) por células Jurkat que expresan CD154 *in vitro*. Preferiblemente, el anticuerpo es capaz de inhibir las células B de rhesus *in vitro* por ejemplo, reduciendo la expresión de CD23, CD80 o CD86. Se describe que el anticuerpo puede ser el anticuerpo 2C10. El anticuerpo puede tener regiones constantes humanas. El anticuerpo es un anticuerpo

60

humanizado. En una divulgación, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Se describe que el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal.

Se describe que el anticuerpo incluye la región variable de la cadena pesada definida por los aminoácidos 20-132 de la SEQ ID NO:2, o una parte de unión al anticuerpo o un fragmento de la misma. El anticuerpo de la invención incluye una forma humanizada de la región variable de cadena pesada definida por los aminoácidos 20-132 de la SEQ ID NO:2, como se especifica en las reivindicaciones. En otra descripción, el anticuerpo incluye una región variable de cadena ligera del anticuerpo que a su vez incluye la secuencia de 23-128 de la SEQ ID NO:4, o una parte de unión al anticuerpo o un fragmento de la misma. El anticuerpo de la invención incluye una forma humanizada de la región variable de cadena ligera del anticuerpo que incluye la secuencia de 23-128 de la SEQ ID NO:4, como se especifica en las reivindicaciones. En otra descripción, la región variable de cadena pesada del anticuerpo incluye los aminoácidos 20-132 de la SEQ ID NO: 2 y la secuencia variable de cadena ligera del anticuerpo incluye los aminoácidos 23-128 de la SEQ ID NO: 4.

La invención también presenta un polinucleótido que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención, un vector que incluye el polinucleótido y una célula que incluye el vector. La célula puede ser eucariótica (por ejemplo, Mamífero, como un humano, ratón, mono o conejo) o puede ser procariótica (por ejemplo, una célula bacteriana como una célula *E. coli*).

Se describe un procedimiento para suprimir el sistema inmunológico en un sujeto (por ejemplo, un mamífero como el humano). El procedimiento incluye administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención al sujeto.

En otra descripción más, se describe un procedimiento para tratar o profilácticamente tratar el rechazo de trasplante o aumentar la duración del tiempo antes de que ocurra el rechazo de trasplante en un sujeto (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano) que lo necesite. El procedimiento incluye administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención al sujeto.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención para uso en la supresión del sistema inmune en un sujeto.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para uso en el tratamiento o tratamiento profiláctico del rechazo de trasplante o el aumento de la duración del tiempo antes de que ocurra el rechazo de trasplante en un sujeto que lo necesite.

En cualquiera de los dos aspectos anteriores, el sujeto puede haber recibido, o puede necesitar un trasplante de órgano (por ejemplo, un corazón, riñón, pulmón, hígado, páncreas, intestino y timo, o una parte del mismo) o un trasplante de tejido (por ejemplo, hueso, tendón, córnea, piel, válvula de corazón, vena o médula ósea). En cualquiera de los dos aspectos anteriores, la administración puede comenzar antes del trasplante o del injerto. La administración puede continuar durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 7 o 10 días; 2, 3, 4, 6, 8, 10 o 12 semanas; 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 24 o 36 meses después del trasplante o el injerto.

Se describe un procedimiento para tratar o tratar profilácticamente la enfermedad de injerto contra huésped en un sujeto (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano) que lo necesite. El uso incluye administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención al sujeto.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención para uso en un procedimiento para tratar o tratar profilácticamente la enfermedad de injerto contra huésped en un sujeto que lo necesite.

Se describe un procedimiento para tratar o tratar profilácticamente un trastorno autoinmune en un sujeto (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano) que lo necesite.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para uso en un procedimiento para tratar o tratar profilácticamente un trastorno autoinmune en un sujeto que lo necesite.

El uso incluye administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención al sujeto. En ciertas realizaciones, el trastorno autoinmune está asociado o está causado por la presencia de un autoanticuerpo (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome CREST (calcinosis, síndrome de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilo y telangiectasia), opsoclonus, miopatía inflamatoria (por ejemplo, polimiositis, dermatomiositis y miositis por cuerpos de inclusión), esclerodermia sistémica, cirrosis biliar primaria,

- enfermedad celíaca (por ejemplo, enteropatía sensible al gluten), dermatitis herpetiforme, síndrome de Miller-Fisher, neuropatía axonal motora aguda (AMAN), neuropatía motora multifocal con bloqueo de la conducción, hepatitis autoinmune, síndrome antifosfolípido, granulomatosis de Wegener, poliangitis microscópica, síndrome de Churg-Strauss, artritis reumatoide, hepatitis autoinmune crónica, escleromiositis, miastenia gravis, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, degeneración cerebelosa paraneoplásica, síndrome de la persona rígida, encefalitis límbica, síndrome de Isaacs, corea de Sydenham, enfermedad neuropsiquiátrica autoinmune pediátrica asociada al estreptococo (PANDAS), encefalitis, diabetes mellitus tipo 1 y neuromielitis óptica). En otras realizaciones, el trastorno se selecciona del grupo que consiste en anemia perniciosa, enfermedad de Addison, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis psoriásica, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso (por ejemplo, lupus eritematoso discoide, lupus eritematoso inducido por fármacos y lupus eritematoso neonatal), esclerosis múltiple y artritis reactiva. En aún otras realizaciones, el trastorno se selecciona del grupo que consiste en polimiositis, dermatomiositis, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, uveítis autoinmune, adrenalitis, tiroiditis, enfermedad autoinmune de la tiroides, atrofia gástrica, hepatitis crónica, hepatitis lupoides, aterosclerosis, demencia presenil, enfermedades desmielinizantes, lupus eritematoso cutáneo subagudo, hipoparatiroidismo, síndrome de Dressler, trombocitopenia autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica, pénfigo vulgar, pénfigo, pénfigo, alopecia areata, pénfigoide, escleroderma, escleroderma sistémica progresiva, diabetes mellitus de comienzo en adultos (por ejemplo, diabetes tipo II), infertilidad autoinmune masculina y femenina, espondilitis anquilosante, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad del tejido conectivo mixto, poliarteritis nodosa, vasculitis necrotizante sistémica, artritis reumatoide de aparición juvenil, glomerulonefritis, dermatitis atópica, rinitis atópica, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Chagas, sarcoidosis, fiebre reumática, asma, aborto recurrente, síndrome antifosfolípido, pulmón de granjero, eritema multiforme, síndrome post cardiotomía, Síndrome de Cushing, hepatitis activa crónica autoinmune, pulmón de pájaro, enfermedad alérgica, encefalomiелitis alérgica, necrólisis epidérmica tóxica, alopecia, síndrome de Alport, alveolitis, alveolitis alérgica, alveolitis fibrosa, enfermedad pulmonar intersticial, eritema nodoso, pioderma gangrenoso, reacción a transfusiones, lepra, malaria, leishmaniasis, tripanosomiasis, arteritis de Takayasu, polimialgia reumática, arteritis temporal, esquistosomiasis, arteritis de células gigantes, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, eczema, granulomatosis linfomatosa, enfermedad de Behcet, síndrome de Caplan, enfermedad de Kawasaki, dengue, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, endoftalmitis, eritema elevatum et diutinum, eritroblastosis fetal, faciitis eosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, filariasis, ciclicidad, ciclicidad crónica, ciclicidad heterocrónica, ciclicidad de Fuch, nefropatía por IgA, púrpura de Henoch-Schonlein, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo al trasplante, infección por virus de la inmunodeficiencia humana, infección por ecovirus, cardiomiopatía, enfermedad de Alzheimer, infección por parvovirus, infección por virus de la rubéola, síndromes posteriores a la vacunación, infección por rubéola congénita, linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin, carcinoma de células renales, mieloma múltiple, síndrome de Eaton-Lambert, policondritis recurrente, melanoma maligno, crioglobulinemia, macroglobulinemia de Waldenström, infección por el virus de Epstein-Barr, paperas, síndrome de Evan e insuficiencia gonadal autoinmune.

En cualquiera de los tres aspectos anteriores, la administración puede ser parenteral, intravenosa, subcutánea, oral, tópica, intratecal, local o por cualquier vía descrita en este documento.

- En cualquiera de los cuatro aspectos anteriores, el uso puede incluir además la administración de un segundo agente dentro de los seis meses (por ejemplo, dentro de los 3, 2 o 1 meses; dentro de las 4, 3, 2 o 1 semanas; dentro de los 6, 5, 4, 3, 2 o 1 días, o dentro de las 18, 12, 6, 3, 2 o 1 horas de la administración del anticuerpo), donde el segundo agente es un inmunosupresor. El segundo agente puede seleccionarse del grupo que consiste en un inhibidor de la calcineurina (por ejemplo, ciclosporina A o ciclosporina G), tacrolimus, un inhibidor mTor (por ejemplo, sirolimus, temsirolimus, zotarolimus, o everolimus), fingolimod, myriocin, alemtuzumab, rituximab, un anticuerpo monoclonal anti-CD4, un anticuerpo monoclonal anti-LFA1, un anticuerpo monoclonal anti-LFA3, un anticuerpo anti-CD45 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD45RB), un anticuerpo anti-CD19, monabatacept, belatacept, indolyl-ASC; azatioprina, globulina inmune de linfocitos y globulina [equina] anti-timocitos, mofetilo de micofenolato, micofenolato de sodio, daclizumab, basiliximab, ciclofosfamida, prednisona, prednisolona, leflunomida, FK778, FK779, busulfan, fludarabina, metotrexato, 6-mercaptopurina, 15-deoxispergualina, LF15-0195, bredinina, brequinar y muromonab-CD3. En ciertas realizaciones, el segundo agente es belatacept.

- Se describe un procedimiento para hacer un anticuerpo. El procedimiento incluye: (a) administrar a un mamífero (por ejemplo, un ratón o un conejo) un polipéptido que comprende un fragmento (por ejemplo, menos de 50, 40, 30, 20, 10 aminoácidos de longitud, pero más de 6, 8 o 10 aminoácidos de longitud) del polipéptido CD40 que incluye el epítipo reconocido por el anticuerpo 2C10, pero no la molécula CD40 de longitud completa de una manera suficiente para generar una respuesta inmune a dicho fragmento; (b) aislar células de bazo del mamífero; (c) formar un hibridoma entre las células de bazo y las células de mieloma; y (d) purificar el anticuerpo producido por el hibridoma. El polipéptido puede ser una proteína de fusión (por ejemplo, entre el fragmento CD40 y la hemocianina de lapa ojo de cerradura o glutatión S-transferasa). También se describe un anticuerpo producido por tal procedimiento.

Se describe un fragmento de CD40 de menos de 150 (por ejemplo, menos de 120, 100, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 12, 11, 10, 9, 8 o 7) aminoácidos de longitud que está específicamente unida por el anticuerpo 2C11. En cierta divulgación, el fragmento es de 8-10, 8-12, 8-15, 8-20, 8-30, 8-40, 8-50, 8-60, 8-70, 8-80, u 8-100 aminoácidos de longitud. En otra divulgación, el fragmento es de 7-10, 7-12, 7-15, 7-20, 7-30, 7-40, 7-50, 7-60, 7-70, 7-80 o 7-100 de longitud. El fragmento de CD40 puede ser del dominio extracelular de CD40 (por ejemplo, SEQ ID NOS:5 y 6). También se describe una proteína de fusión que incluye un fragmento descrito en el presente documento y una secuencia heteróloga.

Por "se une específicamente" se entiende un compuesto o anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo particular pero no reconoce y se une sustancialmente a otras moléculas presentes en una muestra (por ejemplo, una muestra biológica que naturalmente incluye otros polipéptidos, ácidos nucleicos y/u otras moléculas biológicas). En un ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente al epítipo CD40 reconocido por el anticuerpo 2C10 no se une a otros epítopos presentes en CD40.

Por "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo se entiende cualquier fragmento o parte de un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno diana del anticuerpo de longitud completa.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En una modalidad, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la cual los residuos de una región hipervariable (HVR) del receptor se remplazan con residuos de una HVR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como un ratón, una rata, un conejo o un primate no humano, que tiene la especificidad, la afinidad y/o la capacidad deseada. En algunos casos, los residuos de la estructura (FR) (es decir, los residuos en las regiones variables distintas de las regiones hipervariables) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones pueden realizarse para refinar adicionalmente el desempeño de los anticuerpos. En general, un anticuerpo humanizado puede comprender básicamente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, donde todos o básicamente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o básicamente todas las FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, ver, por ejemplo, Jones et al., *Nature* 321:522-25, 1986; Riechmann et al., *Nature* 332:323-29, 1988; y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-6, 1992. Véase también, por ejemplo, Vaswani y otros, *Ann. Allergy Asthma & Immunol.* 1:105-15, 1998; Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-8, 1995; Hurler et al., *Curr. Op. Biotech.* 5: 428-33, 1994; y EE. UU. Números de patente 6,982,321 y 7,087,409.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de un anticuerpo producido por un humano y/o se ha fabricado utilizando cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos como se describe en este documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos se pueden producir utilizando diversas técnicas conocidas, incluidas las bibliotecas de expresión en fago (Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.* 227:381-8, 1992; Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-97, 1991). También se encuentran disponibles procedimientos para preparar anticuerpos monoclonales humanos descritos en Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147:86-95, 1991. Véase también van Dijk et al., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74, 2001. Los anticuerpos humanos pueden prepararse al administrarle el antígeno a un animal transgénico que ha sido modificado para producir tales anticuerpos como respuesta a una exposición antigénica, pero cuyos locus endógenos fueron desactivados, por ejemplo, xenorratones inmunizados (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses número 6,075,181 y 6,150,584 con respecto a la tecnología XenoMouse®). Véase también, por ejemplo, Li et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA* 103:3557-62, 2006 con respecto a los anticuerpos humanos generados a través de una tecnología de hibridoma de células B humanas.

Por "tratar" una enfermedad, trastorno o afección en un sujeto se entiende reducir al menos un síntoma de la enfermedad, trastorno o afección mediante la administración de un agente terapéutico al sujeto.

Por "tratamiento profiláctico" o "tratar profilácticamente" una enfermedad, trastorno o afección en un sujeto significa reducir la frecuencia de aparición o gravedad de (por ejemplo, prevenir) una enfermedad, trastorno o afección administrando al sujeto un agente terapéutico al sujeto antes de la aparición de un síntoma o síntomas de la enfermedad.

El término "una cantidad efectiva" significa la dosis necesaria para tratar efectivamente los efectos fisiológicos de una condición médica (por ejemplo, rechazo de trasplante o enfermedad de injerto contra huésped).

Por "inmunosupresor" se entiende un compuesto o composición que induce inmunosupresión, es decir, reduce (por ejemplo, previene) o interfiere con el desarrollo de una respuesta inmunológica (por ejemplo, celular o humoral).

5 Por "sujeto" se entiende un animal humano o no humano (por ejemplo, un mamífero).

Por "proteína de fusión" se entiende un polipéptido que contiene (a) una proteína o fragmento de la misma de interés; y (b) una pareja de fusión heteróloga.

10 Breve descripción de los dibujos

La **figura 1** muestra las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo 2C10. La secuencia de nucleótidos mostrada para la cadena pesada (SEQ ID NO:1) incluye un péptido señal (nucleótidos 1-57; subrayado) y la secuencia variable de cadena pesada (nucleótidos 58-396). La secuencia de aminoácidos correspondiente se muestra a continuación (SEQ ID NO:2), donde los aminoácidos 1-19 correspondientes a la secuencia de señal (subrayados) y los aminoácidos 20-132 corresponden a la región variable de cadena pesada.

La secuencia de nucleótidos mostrada para la cadena ligera (SEQ ID NO:3) incluye un péptido señal (nucleótidos 1-66; subrayado) y la secuencia variable de cadena ligera (nucleótidos 67-384). La secuencia de aminoácidos correspondiente se muestra a continuación (SEQ ID NO:4), donde los aminoácidos 1-22 corresponden al péptido señal (subrayado) y los aminoácidos 23-128 corresponden a la región variable de cadena ligera.

La **figura 2A** es un gráfico que muestra datos de citometría de flujo que confirman la unión de 2C10 a células B CD20 + humanas y de rhesus.

La **figura 2B** es un gráfico que muestra los datos de adsorción de CD40 de los ensayos ELISA con concentraciones variables de 2C10 para confirmar la unión de 2C10 a CD40 humano y rhesus según se detectó utilizando IgG-HRP anti-ratón de cabra.

La **figura 3** es un gráfico que muestra la inhibición dependiente de la dosis de la unión de CD154 a las células B por 2C10. Las células B se analizaron para determinar la unión de CD154 incubando con CD154 soluble marcado con histidina y analizando la expresión de histidina. Los resultados son representativos de múltiples repeticiones del experimento.

La **figura 4** es un diagrama esquemático y gráficas que muestran el principio del ensayo que involucra células mononucleares de sangre periférica (PBMC) rhesus o humana y células Jurkat.

La **figura 5** es un conjunto de gráficos que muestran la expresión de CD23 en CD20⁺ células tomadas de co-cultivos de PBMC rhesus y células Jurkat en presencia de concentraciones variables de anticuerpos 3A8, 5C8 o 2C10.

La **figura 6** es un conjunto de gráficos que muestran la expresión de CD86 en CD20⁺ células tomadas de co-cultivos de PBMC humano y células Jurkat en presencia de concentraciones variables de anticuerpos 3A8, 5C8 o 2C10.

La **figura 7** es un conjunto de gráficos que muestran la expresión de CD23 en CD20⁺ células de PBMC humanas o de rhesus cultivadas sin células Jurkat en presencia del anticuerpo 3A8 o 2C10.

La **figura 8** es un gráfico que muestra el recuento de células B periféricas de macacos rhesus tratados con formas quiméricas de rhesus de ratón de 2C10 diseñadas para contener regiones constantes de cadena pesada de rhesus IgG1 (2C10R1) o IgG4 (2C10R4), y formas IgG1 quiméricas de anti-CD40 3A8 (3A8R1) o anti-CD40 Chi220 (Chi220). Todos los animales se inmunizaron con hemocianina de lapa de ojo de cerradura conjugada con 4-hidroxi-3-nitrofenilacetilo (KLH) después del primer tratamiento con anticuerpos.

La **figura 9** es un gráfico que muestra las respuestas de anticuerpos dependientes de células T en monos macacos tratados con anticuerpos 2C10R1, 2C10R4 o 3A8R1. Todos los animales se inmunizaron con KLH después del primer tratamiento con anticuerpos.

La **figura 10** es un diagrama que muestra el modelo estándar de macaco de trasplante alogénico de islotes. La diabetes se indujo en monos macacos utilizando estreptozotocina. Los monos diabéticos fueron trasplantados con islotes alogénicos e inmunosupresión iniciada con basiliximab y sirolimus. Los animales experimentales recibieron tratamiento con 2C10R4 los días 0 y 7 después del trasplante.

La **figura 11A** es un gráfico que muestra los niveles de glucosa en sangre (FBG) libres en 4 macacos después del trasplante de islotes, inmunosupresión de fondo y tratamiento con 2C10R4. La línea continua en la gráfica representa el nivel de 2C10 en el plasma.

La **figura 11B** es un gráfico que muestra FBG en macacos que recibieron solo inmunosupresión de fondo.

La **figura 12** es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de bloqueo competitivo utilizando PBMC humanas incubadas con concentraciones crecientes de anticuerpos 2C10, 3A8 o Chi220 y teñidas con un 2C10 conjugado con APC para evaluar la capacidad de cada anticuerpo para interbloquear 2C10.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a anticuerpos humanizados anti-CD40 y fragmentos de anticuerpos como se especifica en las reivindicaciones que tienen la capacidad de unirse a un epítipo particular en la molécula CD40, así

como a usos de dichos anticuerpos. Esta especificidad epitópica confiere un perfil de actividad particular, de modo que los anticuerpos generalmente bloquean la capacidad de CD40 para interactuar con sus compañeros de unión (por ejemplo, CD154) y lo hacen sin activar la célula que expresa CD40. Se entiende que este perfil de actividad hace que estos anticuerpos sean particularmente útiles para reducir las complicaciones asociadas con el trasplante de órganos o tejidos.

Producción e Identificación de anticuerpos CD40.

Los ratones (cepa AJ) se inmunizaron con una proteína de fusión que consiste en el dominio extracelular del macaco rhesus (M. *mulatta*) CD40 (secuencia de aminoácidos: EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECCLPCSESEFLDTWNRETRCHQHKYCDP NLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGLHCMSESCESC; SEQ ID NO:5) fusionada a la proteína de unión a maltosa (CD40-MBP). La secuencia de aminoácidos en esta región de la proteína CD40 del macaco rhesus difiere de la proteína CD40 humana en cinco posiciones de aminoácidos (secuencia de aminoácidos humanos: EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECCLPCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDP NLGLRVQQKGTSETD TICTCEEGLWHCTSEACESECV; SEQ ID NO:6). Se administró CD40-MBP a ratones varias veces con adyuvante completo de Freund y adyuvante incompleto de Freund. Los esplenocitos de ratones inmunizados se fusionaron con la línea celular de mieloma de ratón SP2 / 0 y los híbridos se seleccionaron usando tecnología de hibridoma estándar.

Los anticuerpos se seleccionaron para la reactividad a una segunda proteína de fusión que consiste en el mismo dominio CD40 de rhesus fusionado a la glutamina sintetasa (CD40-GST). Los anticuerpos reactivos a CD40-GST por ELISA se probaron adicionalmente para determinar la reactividad a CD40 nativo expreso en células B de sangre de macaco rhesus, células B de sangre humana y líneas celulares de linfoblastoide B de macaco rhesus mediante citometría de flujo. Como nivel final de selección, los anticuerpos se probaron en un ensayo in vitro para determinar su capacidad para inhibir la activación de células B de macacos Rhesus o humanos después de co-cultivo de células Jurkat D1.1 que expresan CD154. Se obtuvo un subclón estable del anticuerpo anti-CD40 2C10 limitando la dilución. El anticuerpo es un ratón IgG1-kappa.

30 Clonación de anticuerpos

Las regiones variables de anticuerpos monoclonales se pueden clonar utilizando cualquier procedimiento conocido en la técnica. Los procedimientos basados en PCR para obtener secuencias de regiones variables de anticuerpos para células de hibridoma se describen, por ejemplo, en Larrick et al., Nat. Biotechnol. 7: 934-8, 1989 y en Orlandi et al., Proc. Natl Acad Sci. USA 86: 3833-7, 1989. Usando estas técnicas o técnicas similares, las regiones variables de los anticuerpos monoclonales pueden clonarse y someterse a una manipulación adicional.

En el presente caso, las secuencias variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo 2C10 se clonaron y se secuenciaron. El ADN que representa las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina del hibridoma 2C10 se clonó utilizando PCR para RACE 5' empleando los siguientes cebadores de ADN:

Ratón kappa inverso: 5'-CTA ACA CTC ATT CCT GTT GAA GCT CTTGAC (SEQ ID NO:7);
 Ratón kappa adelante: 5'-GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC - 3' (SEQ ID NO:8)
 Ratón IgG1 inverso: 5'-GGC AAC GTT GCA GGT CTC GC - 3' (SEQ ID NO:9)
 Ratón IgG1 adelante: 5' - CTG GAT CTG CCC AAA CTA ACT CC - 3' (SEQ ID N.º:10)

Los productos de PCR se clonaron en un vector de clonación comercial y se secuenciaron utilizando técnicas de secuenciación estándar. Las secuencias resultantes se proporcionan en la figura 1.

Los genes de la región variable de inmunoglobulina se clonaron a partir del clon 2C10 del anticuerpo anti-CD40 secretor de hibridomas y del clon 3A8 anti-CD40 humano (Kwekkeboom et al., Immunology 79: 439-44, 1993 (Obtenido de la American Type Culture Collection, ATCC, Vienna, VA) que utiliza una amplificación rápida en 5' de la reacción en cadena de la polimerasa de extremos de ADNc. Las regiones variables de la cadena ligera y pesada de inmunoglobulina se subclonaron en vectores de expresión que contenían secuencias de rhesus IgG1 o rhesus IgG4 de cadena pesada y rhesus kappa de cadena ligera.

Las cadenas pesadas y ligeras recombinantes se subclonaron en vectores de expresión y se empaquetaron en vectores retrovirales utilizados para transducir células de ovario de hámster chino utilizando la tecnología de expresión GPEX™ (Catalent Pharma Solutions, Middleton, WI). Se cultivó un conjunto de células transducidas en medio sin suero y el anticuerpo secretado se purificó mediante cromatografía de afinidad de proteína A. Los anticuerpos rhesus IgG1 (2C10R1, 3A8R1) e IgG4 (2C10R4) quiméricos purificados se diafiltraron en tampón fosfato; se confirmó que los niveles de endotoxina eran menores que 1 unidad de endotoxina/mg.

Caracterización de anticuerpos

2C10 se une a CD40 y evita la unión de CD154

5

Para evaluar la capacidad de 2C10 para unirse a CD40 tanto rhesus como humano, los CD40 humanos o rhesus expresados de forma recombinante se adsorbieron a las placas de ELISA y reaccionaron con concentraciones variables de 2C10. Se detectó la unión de 2C10 a CD40 utilizando IgG-HRP anti-ratón de cabra en un ELISA. Los resultados en la figura 2B muestran que 2C10 tienen afinidades de unión similares a CD40 rhesus y humano, lo cual es importante para la traducción clínica de 2C10. Para confirmar la capacidad del 2C10 para bloquear la unión de su ligando afín, se incubaron células B CD154, rhesus y humanas con concentraciones crecientes de 2C10 o control de isotipo y luego se incubaron con CD154 soluble marcado con histidina (R&D Systems, Minneapolis, MN) y analizado para la expresión de histidina. 2C10 bloqueó la unión de CD154 de una manera dependiente de la dosis (figura 3), lo que indica que 2C10 puede bloquear efectivamente la interacción de CD154 unido a células T con CD40 en células B y células presentadoras de antígeno.

2C10 bloquea la activación de las células B en monos rhesus y células mononucleares de sangre periférica humana

El anticuerpo CD40 2C10 se caracterizó con respecto a su capacidad para afectar la activación de células B utilizando monos rhesus y células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC). La expresión de CD20 se eligió como un indicador de células B, y la expresión de CD23, CD80 y CD86 está asociada con la activación de células B. Primero se evaluó 2C10 por su capacidad para unirse a CD20. Se incubaron PBMC de Rhesus o humanas con 2C10 conjugado con fluorocromo y un anticuerpo anti-CD20. Se usó un análisis de citometría de flujo para confirmar la unión de 2C10 a células humanas y de rhesus B CD20+ (figura 2A). En otro conjunto de experimentos, se cultivaron PBMC, ya sea de monos rhesus o de humanos en presencia o ausencia de CD154⁺ Células Jurkat D1.1, una línea celular inmortalizada de linfocitos T. La activación de las células B se determinó midiendo la expresión de tres marcadores (CD23, CD80 y CD86) en CD20⁺ células presentes en los PBMCs. El esquema general de este ensayo se muestra en la figura 4. Como se muestra en la figura 4, el cultivo de PBMC en presencia de células Jurkat dio como resultado un aumento de la expresión de los tres marcadores, lo que indica que las células B son activadas por el CD154⁺ células Jurkat.

Para probar la capacidad de los anticuerpos para bloquear la activación de las células B, las PBMC y las células Jurkat se cultivaron conjuntamente en presencia o ausencia de uno de los tres anticuerpos: 3A8, 5C8 y 2C10. El anticuerpo 3A8 es un anticuerpo CD40 antihumano de ratón (ATCC Deposit No. HB-12024), y 5C8 es un anticuerpo anti-CD154 (ATCC Deposit No. CRL-10915). Cada uno se utilizó como control positivo. Los co-cultivos se realizaron en un rango de cinco órdenes de magnitud de concentración de anticuerpos (0,001 µg a 10 µg). Como se muestra en la figura 5, el 3A8 no bloqueó la activación de las células B en las PBMC rhesus, medida por la expresión de CD23, mientras que tanto el 2C10 como el 5C8 pudieron bloquear la activación con una eficiencia similar. También se observaron cambios correspondientes con la expresión de CD80 y CD86. Estos resultados indican que 2C10 se une a un epítipo diferente en CD40 que 3A8. Estos resultados también indican que el 2C10 actúa principalmente como un antagonista de CD40 en contraste con el 3A8 que se ha demostrado anteriormente que actúa como agonistas parciales con un potencial estimulante débil (Adams et al., J. Immunol. 174: 542-50, 2005, Badell et al., Enm. J. Transplant. aceptado para publicación, 2011). Cuando se realizó un experimento similar utilizando humanos, en lugar de rhesus, se observó nuevamente que las PBMC, tanto la 2C10 como la 5C8 bloquean la activación de las células B, según lo medido por la expresión de CD86, con una eficiencia similar. Aquí, el anticuerpo 3A8, a diferencia de las PBMC rhesus, bloqueó la activación de las células B (figura 6).

Los anticuerpos 2C10 y 3A8 también se probaron para determinar su capacidad para activar células B en ausencia de células Jurkat utilizando PBMC de monos rhesus o humanos. Aquí, las PBMC se cultivaron en presencia o ausencia de 2C10 o 3A8. La expresión de CD23, CD80 y CD86 se midió luego en CD20⁺ células. Como se muestra en la figura 7, la expresión de CD23 en células rhesus aumentó en presencia del anticuerpo 3A8, pero no del 2C10. Por el contrario, ni el 3A8 ni el 2C10 activaron las células B humanas. Las diferencias en la actividad observadas entre el anticuerpo 3A8 y 2C10 indican que el anticuerpo 2C10 se une a un epítipo diferente al del anticuerpo 3A8.

2C10 previene una respuesta de anticuerpos dependiente de células T

Habiendo establecido que 2C10 se une a un epítipo único en CD40, inhibe la activación de células B de manera similar a un anticuerpo anti-CD 154, y carece de propiedades agonísticas, luego caracterizamos los efectos de 2C10 in vivo. Se generaron formas quiméricas de rhesus de ratón recombinante de 2C10 utilizando las secuencias de región constante de rhesus IgG1 (2C10R1) o IgG4 (2C10R4) de cadena pesada, y rhesus kappa de cadena ligera. También se generó una forma de IgG1 rhesus quimérico de 3A8 (3A8R1) para su uso como control.

Los macacos rhesus se inmunizaron una vez en el día cero con antígeno de hemocianina de lapa de ojo de cerradura conjugado con 4-hidroxi-3-nitrofenilacetilo (KLH, 10 mg IM) (Biosearch Technologies, Novato, CA). Antes de la inmunización y a la semana, las cohortes de tres animales recibieron una dosis intravenosa (50 mg/kg) de 2C10R1, 2C10R4, 3A8R1 o solución salina. Todos los animales se observaron durante 70 días y se realizó semanalmente la citometría de flujo. El tratamiento con cualquiera de los isotipos 2C10 recombinantes dio lugar a un cambio modesto en los recuentos de células B periféricas (figura 8) en comparación con el agotamiento significativo y prolongado de células B periféricas reportado anteriormente que ocurre en animales que reciben 3A8R1 (Badell et al., *Enm. J. Transplant.* 10: 214, 2010) o Chi220 (Adams et al., *J. Immunol.* 174: 542-50, 2005).

Las respuestas de anticuerpos dependientes de células T a KLH-NP se analizaron mediante ELISA. Las placas se recubrieron con KLH (0.01 mg/ml, Sigma, St. Louis, MO) y se bloquearon con Super Block (Thermo Scientific, Woodstock, GA). Las muestras de plasma antes y después del tratamiento se diluyeron en serie, se sembraron en placas durante 1 hora y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato/Tween al 0.05 %. Los anticuerpos anti-KLH se detectaron incubando durante 1 hora con peroxidasa de rábano picante monoclonal anti-rhesus IgG (clon 1B3, Regeant Resource, NHP, Boston, MA). Las placas se incubaron luego con solución de sustrato de peroxidasa (KPL). Luego se agregó la solución de parada (KPL) y se leyó la densidad óptica en un lector de placas ELISA a 450 nm. Una muestra se consideró positiva a una dilución dada si la lectura de la densidad óptica del plasma posterior al tratamiento excedía la densidad óptica del plasma previo al tratamiento en la misma dilución dos veces. Tras la inmunización con KLH, los animales de control desarrollaron IgG específica para KLH de alto título (figura 9). Los animales que recibieron 3A8R1 también desarrollaron respuestas anti-KLH, pero los títulos fueron aproximadamente 10 veces más bajos que los controles a pesar del importante agotamiento de las células B. En contraste, la generación de anticuerpos IgG anti-KLH se bloqueó casi por completo hasta el día 56 en todos los animales que recibieron 2C10R1 o 2C10R4.

2C10 prolonga significativamente la supervivencia del aloinjerto de islotes en un modelo de macaco de trasplante aloténico de islotes

Además, probamos 2C10R4, el anticuerpo IgG4 rhesis quimérico purificado en CD4, en un modelo de trasplante de islote aloténico de primate no humano (figura 10). Los macacos rhesus que pesaban 10-20 kg se sometieron a una pancreatectomía del donante un día antes del trasplante a través de una laparotomía de línea media. El páncreas se aisló y se colocó en hielo después de que los animales se desangraron terminalmente. El aislamiento de los islotes se realizó utilizando proteasa colagenasa/neutra (950 unidades de Wunsch y 63 unidades, respectivamente; Serva, Heidelberg, Alemania). El páncreas digerido se purificó en un gradiente de Euroficoll discontinuo de cuatro capas (Mediatech, Manassas, VA) y un procesador de células sanguíneas Cobe 2991 (CaridianBCT, Lakewood, CO). Las muestras de la preparación final de los islotes se contaron y se expresaron como equivalentes de islotes (IEQ). Los islotes aislados se cultivaron durante la noche, se contaron y se suspendieron en medios de trasplante (Mediatech).

Los macacos rhesus con un peso de 3-5 kg se hicieron diabéticos utilizando estreptozotocina (1250 mg/m² IV; Zanosar, Teva Parenteral Medicines, Irvine, CA) cuatro semanas antes del trasplante. La diabetes se confirmó mediante una prueba de tolerancia a la glucosa por vía intravenosa (IVGTT) con un bolo de dextrosa de 500 mg/kg y la medición del péptido C de primate. Se controlaron los niveles de glucosa, y el péptido C se midió al inicio del estudio y 10, 30, 60 y 90 después de la inyección de dextrosa. La diabetes se confirmó mediante la medición de niveles elevados de glucosa en sangre en ausencia de péptido C en suero detectable. Los receptores diabéticos se sometieron a un alotrasplante de islotes no coincidentes con el MHC. Se infundió una media de 15,745 ($\pm$ 4,063) IEQ a través de una pequeña laparotomía de línea media y canulación de una vena mesentérica.

Los niveles de glucosa en sangre se midieron dos veces al día con un auricular; Se administró insulina NPH (Novolin; Novo Nordisk, Princeton, NJ) y glargina (Lantus; Sanofi-Aventis, Bridgewater, NJ) para mantener la glucemia en sangre en ayunas (FBG) a menos de 300 mg/dL antes del trasplante y después del rechazo del injerto. IVGTT se realizó periódicamente después del trasplante para controlar la función del injerto. Los receptores de trasplantes se sometieron a un análisis de citometría de flujo semanal para controlar las poblaciones de células T (CD3 V450, CD4 PerCP-Cy5.5, CD8 PerCp; BD Bioscience) y células B (CD20 PE, BD Bioscience). Después de que el rechazo del injerto de islotes se definió como FBG mayor de 130 mg/dL en dos días consecutivos. El punto final primario fue la supervivencia del injerto de islotes sin rechazo. Todos los animales utilizados en estos experimentos fueron tratados según la Universidad Emory IACUC y la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

Los receptores de trasplantes recibieron 2C10R4, basiliximab (Simulect, Novartis, Basilea, Suiza) y sirolimus, o basiliximab y sirolimus solo. 2C10R4 (50 mg/kg) se administró por vía intravenosa en el día postoperatorio (POD) 0 y 7. Basiliximab (0.3 mg/kg) se administró por vía intravenosa en los POD 0 y 3. Sirolimus se administró por vía intramuscular diariamente para alcanzar niveles mínimos de 5-15 ng/ml hasta el POD 120. Los tres animales que

reciben basiliximab y sirolimus solo son controles históricos (Badell et al., J Clin. Invest. 120:4520-312, 2010). Dos de estos controles históricos (RQz6 y Rlb7) se sometieron a la inducción de la diabetes por pancreatectomía y recibieron sirolimus oral.

- 5 El tratamiento con los regímenes descritos anteriormente dio como resultado una supervivencia significativamente prolongada del injerto de islotes (figura 11A) en comparación con los controles que recibieron solo la inducción con basiliximab y la terapia de mantenimiento con sirolimus (figura 11B). El tiempo medio de supervivencia del injerto libre de rechazo para los animales que recibieron 2C10R4 es de 280 días en comparación con los 8 días para los animales de control ($p=0.010$, tabla 1). Los datos farmacocinéticos predicen que los niveles de 2C10R4 en plasma serían inferiores a 1 µg/ml para el POD 100. Debido a que sirolimus se suspendió en POD120, el receptor con la supervivencia más prolongada (304 días) no recibió inmunosupresión durante aproximadamente 24 semanas antes del rechazo. Ningún animal tratado con 2C10R4 desarrolló complicaciones infecciosas clínicamente relevantes o pérdida de peso. Estos resultados reflejan animales que recibieron el isotipo IgG4 de 2C10. Dos animales adicionales que recibieron el isotipo IgG1 de 2C10 (2C10R1) en combinación con basiliximab y sirolimus lograron una supervivencia de injerto similarmente prolongada de 220 y 162 días (datos no mostrados). Dados los resultados positivos con 2C10 utilizado como terapia de inducción, el siguiente paso es evaluar los efectos sobre la supervivencia del injerto administrando 2C10 como terapia de mantenimiento.

Tabla 1

Destinatario	Terapia	IEQ/kg	Supervivencia injerto (días)	del	Comentario
DP4A	2C10R4/Basiliximab/Sirolimus	21973	296		Rechazo
RAo13	2C10R4/Basiliximab/Sirolimus	14388	304		Rechazo
RZq13	2C10R4/Basiliximab/Sirolimus	15881	265		Rechazo
RRq13	2C10R4/Basiliximab/Sirolimus	20596	163		Rechazo
RQz6	Basiliximab/Sirolimus	12980	8		Rechazo
Rlb7	Basiliximab/Sirolimus	10903	8		Rechazo
RMc11	Basiliximab/Sirolimus	13796	10		Rechazo

Bloqueo de la vía CD40/CD154 junto con la vía CD28/B7

- El bloqueo de la vía CD40/CD 154 puede resultar útil junto con otros agentes de bloqueo de coestimulación. Belatacept, una versión de alta afinidad de CTLA4-Ig diseñada para bloquear las vías coestimuladoras de CD28/B7, ha demostrado eficacia en modelos de primates no humanos de trasplante renal y de islotes y en ensayos clínicos de fase II y III en trasplante renal (Larsen et al., Transplantation 90:1528-35, 2010, Vincenti et al., AM. J. Transplant. 10:535-46, 2010, Adams et al., J. Immunol. 174: 542-50, 2005, Adams et al., Diabetes 51: 265-70, 2002, Larsen et al., Am. J. Transplant. 5:443-53, 2005, Vincenti et al., N. Engl. J. Med. 358:770-81, 2005). El ensayo BENEFIT reveló una función renal superior en pacientes tratados con belatacept; sin embargo, estos pacientes tuvieron una mayor incidencia y un grado más severo de rechazo agudo comprobado por biopsia (Larsen et al., Transplantation 90:1528-35, 2010, Vincenti et al. Am. J. Transplant. 10:535-46, 2010). En vista de este aumento en la tasa de rechazo agudo y la sinergia entre el bloqueo de CD40 y B7 (Larsen et al., Nature 381: 434-8, 1996), a continuación, queremos probar la eficacia de la terapia combinada con 2C10 y belatacept en el trasplante de riñón de primates no humanos.

Mapeo Epítipo

- Los procedimientos para identificar el epítipo particular al que se une un anticuerpo son conocidos por los expertos en la materia. Las técnicas estándar incluyen el escaneo de péptidos, en el que los péptidos cortos superpuestos (por ejemplo, 10-30 aminoácidos, por ejemplo, 20, de longitud) derivados de la proteína de longitud completa a la que se une el anticuerpo se analizan individualmente para determinar su capacidad para unirse al anticuerpo. A partir de tales experimentos, se puede determinar la región de la proteína a la que se une el anticuerpo.

- La mutagénesis dirigida al sitio también se puede usar para identificar la/s región/es antigénica/s de una proteína en particular. En este enfoque, las mutaciones puntuales se introducen sistemáticamente en el polipéptido diana y la capacidad del anticuerpo para unirse al péptido con mutaciones en varias posiciones se usa para determinar si una región particular de esa proteína contiene el epítipo al que se une el anticuerpo.

- Los epítipos de anticuerpos también pueden identificarse utilizando técnicas de mutagénesis de alto rendimiento, como la mutagénesis por disparo (Integral Molecular, Inc., Filadelfia, PA), que pueden usarse para generar grandes números de mutaciones dentro de la proteína diana. Tales metodologías permiten una identificación eficiente de los

epítomos dentro de la proteína.

Para determinar si varios anticuerpos contra CD40 se unen a epítomos similares, se realizó un ensayo de bloqueo competitivo *in vitro*. Los anticuerpos 2C10, 3A8 y Chi220, un anticuerpo IgG1 CD40 quimérico específico, se utilizaron en el ensayo. El 2C10 se conjugó con la alofococianina (APC) utilizando el kit de marcado de anticuerpos Lightning Link (Novus Biologics, Littleton, CO). Las PBMC humanas se incubaron con concentraciones crecientes de 2C10, 3A8 o Chi220, y luego se tiñeron con el 2C10 conjugado con APC para evaluar la capacidad de cada anticuerpo para interbloquear 2C10. La unión de 2C10 conjugado con APC disminuyó con concentraciones crecientes de 2C10 pero no Chi220 o 3A8 como se muestra en la figura 12. El resultado indica que 2C10 se une a un epítomo único distinto de Chi220 o 3A8.

Generación de anticuerpos adicionales

Se pueden producir anticuerpos adicionales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, policlonales, poli-específicos o mono-específicos) contra el epítomo CD40 reconocido por 2C10, por ejemplo, usando cualquiera de los numerosos procedimientos para producir anticuerpos conocidos en la técnica. En un ejemplo, una secuencia de codificación para un epítomo reconocido por el anticuerpo 2C10 se expresa como una fusión C-terminal con glutatión S-transferasa (GST) (Smith et al., *Gene* 67:31-40, 1988). La proteína de fusión se purifica en perlas de glutatión-sefarosa, se eluye con glutatión, se escinde con trombina (en un sitio de escisión de ingeniería) y se purifica para la inmunización de conejos. Las inmunizaciones primarias se llevan a cabo con el adyuvante completo de Freund y las inmunizaciones posteriores con el adyuvante incompleto de Freund. Los títulos de anticuerpos se controlan mediante transferencia Western y análisis de inmunoprecipitación utilizando el fragmento de proteína escindida con trombina de la proteína de fusión GST. Los sueros inmunes se purifican por afinidad utilizando la proteína acoplada a CNBr-Sepharose. La especificidad del antisuero se puede determinar utilizando un panel de proteínas GST no relacionadas.

Como un inmunógeno alternativo o adyuvante a las proteínas de fusión GST, se pueden generar péptidos correspondientes a regiones inmunogénicas relativamente únicas de un polipéptido descrito y acoplarse a la hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH) a través de una lisina C-terminal introducida. El antisuero para cada uno de estos péptidos se purifica por afinidad en péptidos conjugados con BSA, y la especificidad se analiza mediante ELISA o análisis de transferencia Western utilizando conjugados peptídicos, o mediante transferencia Western o inmunoprecipitación utilizando el polipéptido expresado como una proteína de fusión GST.

Alternativamente, los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al epítomo de CD40 reconoció que el anticuerpo 2C10 se puede preparar usando tecnología de hibridoma estándar (ver, por ejemplo, Kohler et al., *Nature* 256: 495-7, 1975; Kohler et al., *Eur. J. Immunol* 6:511-9, 1976; Kohler et al., *Eur. J. Immunol.* 6:292-5, 1976; Hammerling et al., *Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas*, Elsevier, NY, 1981). Una vez producidos, los anticuerpos monoclonales también pueden probarse para el reconocimiento específico por transferencia Western o análisis de inmunoprecipitación. Alternativamente, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando el polipéptido descrito anteriormente y una biblioteca de expresión en fago (Vaughan et al., *Nat. Biotechnol.* 14:309-14, 1996).

Los fragmentos epitópicos pueden generarse mediante técnicas estándar, por ejemplo, utilizando PCR y clonando el fragmento en un vector de expresión pGEX. Las proteínas de fusión se expresan en *E. coli* y se purifican utilizando una matriz de afinidad de glutatión agarosa. Para minimizar los problemas potenciales de baja afinidad o especificidad de los antisueros, se generan dos o tres de tales fusiones para cada proteína, y cada fusión se inyecta en al menos dos conejos. Los antisueros se producen mediante inyecciones en una serie y pueden incluir, por ejemplo, al menos tres inyecciones de refuerzo.

Para generar anticuerpos policlonales a gran escala y a bajo costo, se puede elegir una especie animal apropiada. Los anticuerpos policlonales se pueden aislar de la leche o el calostro de, por ejemplo, vacas inmunizadas. El calostro bovino contiene 28 g de IgG por litro, mientras que la leche bovina contiene 1.5 g de IgG por litro (Ontsouka et al., *J. Dairy Sci.* 86:2005-11, 2003). Los anticuerpos policlonales también se pueden aislar de la yema de huevos de pollos inmunizados (Sarker et al., *J. Pediatr. Gastroenterol. Gard.* 32:19-25, 2001).

Los adyuvantes múltiples están aprobados para su uso en vacas lecheras. Los adyuvantes útiles en esta descripción incluyen, pero no se limitan a, Emulsigen®, un adyuvante emulsionado de aceite en agua, Emulsigen®-D, un adyuvante emulsionado de aceite en agua con inmunoestimulante DDA, Emulsigen®-P, un aceite adyuvante emulsionado en agua con inmunoestimulante de copolímero, Emulsigen®-BCL, un adyuvante emulsionado de aceite en agua con inmunoestimulante de copolímero de bloque, Carbigen™, una base de carbómero, y Polygen™, una base de copolímero. Todos los adyuvantes listados están disponibles comercialmente en MVP Laboratories en Omaha, Nebr.

Los anticuerpos útiles se pueden identificar en varios ensayos de selección diferentes. Primero, los anticuerpos se analizan mediante ELISA para determinar si son específicos para el antígeno inmunizante (es decir, el epítipo CD40 descrito aquí). Usando técnicas estándar, las placas ELISA se recubren con inmunógeno, el anticuerpo se agrega a la placa, se lava y la presencia del anticuerpo unido se detecta utilizando un segundo anticuerpo específico para la Ig de la especie en la que se generó el anticuerpo.

Se puede usar un ensayo in vitro funcional para detectar anticuerpos, por ejemplo, un ensayo neutralizante basado en células dendríticas derivadas de monocitos.

10 Las mediciones directas de la inmunoglobulina bovina en el fluido ileal en sujetos humanos han demostrado que cantidades significativas de inmunoglobulina sobreviven al tránsito a través del estómago y el intestino delgado (Warny et al., Gut 44:212-7, 1999). También se han descrito procedimientos para formular inmunoglobulina aviar (IgY) para el suministro de GI (Kovacs-Nolan et al., Immunol. Methods 296:199-209, 2005).

15 Anticuerpos humanizados

La invención abarca anticuerpos humanizados como se especifica en las reivindicaciones. Se conocen diversos procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él desde una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente como residuos "importados", que se toman típicamente de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y compañeros de trabajo (Jones et al., Nature 321:522-5, 1986; Riechmann et al., Nature 332:323-7, 1988; Verhoeyen et al., Science 239:1534-6, 1988), sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente estadounidense N.º 4,816,567) donde bastante menos que un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los cuales al menos algunos residuos de la región hipervariable así como otros residuos de la región variable están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

30 La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usar en la fabricación de los anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad. Según el llamado procedimiento "de mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se analiza al compararla con la biblioteca completa de secuencias humanas de dominio variable conocidas. La secuencia humana que esté más próxima a la del roedor se acepta entonces como el marco humano para el anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, Sims et al., J. Immunol. 151:2296-308, 1993; Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-17, 1987. Otro procedimiento utiliza un marco particular derivado de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Puede usarse el mismo marco para varios anticuerpos humanizados diferentes. Véase, por ejemplo, Carter et al., Proc. Natl Acad Sci. USA 89:4285-9, 1992; Presta et al., J. Immunol. 151:2623-32, 1993.

40 También es generalmente deseable que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, según un procedimiento, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de las secuencias originales y varios productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Hay disponibles programas de computadora que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis del posible rol de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De esta forma, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias receptoras e importadas, de forma tal que se logre la característica del anticuerpo deseada, tal como una mejor afinidad por el o los antígenos diana. En general, los residuos de regiones hipervariables están directamente y más sustancialmente implicados en influenciar la unión al antígeno.

55 Anticuerpos humanos

Los anticuerpos humanos de la presente divulgación pueden construirse combinando la secuencia o secuencias de dominio variable del clon Fv seleccionadas de bibliotecas de expresión in fago derivadas de seres humanos con secuencia/s de dominio constante humanas conocidas (Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227:381-8, 1992; Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-97, 1991). De manera alternativa, los anticuerpos monoclonales humanos se pueden elaborar mediante el procedimiento de hibridoma. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma ratón-humano

para la producción de anticuerpos monoclonales humanos se han descrito, por ejemplo, en Kozbor, J. *Immunol.* 133:3001-5, 1984; Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner et al., *J. Immunol.* 147: 86-95, 1991.

- 5 En la actualidad es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que sean capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigota del gen de la región de unión de cadena pesada de anticuerpo (JH) en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal da como resultado una inhibición completa de la producción endógena de anticuerpo. La transferencia de una matriz genética de
- 10 inmunoglobulina de línea germinal humana a dichos ratones con mutaciones de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos al exponerlos a antígenos. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA* 90:2551-5, 1993; Jakobovits et al., *Nature* 362:255-8, 1993; Brüggemann et al., *Year Immunol.* 7:33-40, 1993.
- 15 La transposición génica también se puede utilizar para derivar anticuerpos humanos de no humanos, por ejemplo, roedores, anticuerpos en los que el anticuerpo humano tiene especificidades y afinidades similares respecto al anticuerpo no humano de partida. Según este procedimiento, que también se llama "impresión de epítipo", se reemplaza ya sea la región variable de cadena pesada o ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido mediante técnicas de expresión en fagos tal como se describe en la presente con un repertorio de genes de dominio
- 20 V humano, creando una población de quimeras scFv o Fab de cadena no humana/cadena humana. La selección con antígenos tiene como resultado el aislamiento de scFv o Fab quimérico de cadena no humana/cadena humana donde la cadena humana restaura el sitio de unión al antígeno destruido al eliminar la cadena no humana correspondiente en el clon de expresión en fago principal, es decir, el epítipo rige (imprime) la elección del compañero de cadena humana. Cuando el procedimiento se repite para reemplazar la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo
- 25 humano (ver la publicación PCT WO 93/06213). A diferencia de la humanización tradicional de los anticuerpos no humanos mediante injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen residuos de CDR o FR de origen no humano.

Fragmentos de anticuerpos

- 30 Se describen fragmentos de anticuerpo que comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que comprende preferiblemente la región de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.
- 35 La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina proporciona un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación de antígenos y aun así es capaz de reticular el antígeno.
- 40 Fv es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión al antígeno completo. En una modalidad, una especie Fv de cadena doble consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en una asociación no covalente fuerte. En una especie Fv de cadena simple (scFv), un dominio variable de cadena ligera y uno de cadena pesada pueden unirse covalentemente por un enlazador peptídico flexible de modo que las
- 45 cadenas ligera y pesada puedan asociarse en una estructura "dimérica" análoga a aquella en una especie Fv de cadena doble. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables (HVR) de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígenos en la superficie del dímero VH-VL. De forma conjunta, las seis HVR confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un dominio variable simple (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse
- 50 al antígeno, aunque a una afinidad menor que todo el sitio de unión.

El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena pesada y de cadena ligera y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de

- 55 la cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación que se utiliza en la presente para el Fab' en que el o los residuos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tenían cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamiento químicos de fragmentos de anticuerpos.

- 60 Los fragmentos de anticuerpo Fv o scFv de cadena simple comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L, donde estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido scFv comprende

adicionalmente un enlazador polipeptídico entre los dominios de V_H y V_L que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para acceder a una revisión de scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York, 1994), págs. 269-315.

- 5 Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L). Al utilizar un enlazador que es muy corto como para permitir el apareamiento entre dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven forzados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y a
- 10 crear dos sitios de unión a antígenos. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen con más detalle, por ejemplo, en la Patente Europea No. 404,097; Publicación PCT WO 1993/01161; Hudson et al., *Nat. Medicina*. 9: 129-34, 2003; y Hollinger et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA* 90:6444-8, 1993. Los triacuerpos y tetracuerpos se describen también en Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-34, 2003.
- 15 Los fragmentos de anticuerpos pueden generarse por medios tradicionales, como la digestión enzimática, o por técnicas recombinantes. En determinadas circunstancias, el uso de fragmentos de anticuerpo implica ventajas respecto al uso de anticuerpos completos. El menor tamaño de los fragmentos hace posible una depuración rápida y puede conducir a un mejor acceso a tumores sólidos. Para un análisis de determinados fragmentos de anticuerpos, véase Hudson et al., *Nat Med.* 9:129-134, 2003.
- 20 Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (ver, por ejemplo, Morimoto et al., *J. Biochem. Biophys. Methods* 24: 107-17, 1992; y Brennan et al., *Science* 229:81-3, 1985). Sin embargo, ahora pueden producirse estos fragmentos directamente mediante células huésped recombinantes. Todos los fragmentos de
- 25 anticuerpo Fab, Fv y ScFv se pueden expresar y secretarse en *E. coli*, de forma que sea posible la producción de grandes cantidades de dichos estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar de las bibliotecas de fagos de anticuerpo. De manera alternativa, es posible recuperar directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplarlos químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-7, 1992). En otro enfoque, los fragmentos $F(ab')_2$ se aíslan directamente del cultivo de células hospedadoras recombinantes. Se
- 30 describen fragmentos Fab y $F(ab')_2$ con mayor semividia in vivo que comprenden residuos de epítipo de unión a receptor salvaje en la patente estadounidense N.º 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el practicante capacitado.

Composiciones farmacéuticas

- 35 Se presenta una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene un anticuerpo, o parte/s de unión a antígeno del mismo, como se especifica en las reivindicaciones, formulada junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes (por ejemplo, inmunosupresores).
- 40 Tal como se usa en la presente, un "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares, que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el portador es adecuado para la administración intravenosa, intratecal, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, los anticuerpos de la invención pueden
- 45 recubrirse con un material para proteger el compuesto de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

- Una composición de la presente invención se puede administrar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Como apreciarán los expertos en la materia, la ruta y/o el modo de administración variarán dependiendo
- 50 de los resultados deseados. La administración puede ser parenteral, intravenosa, intratecal, subcutánea, oral, tópica o local, por ejemplo, mediante inyección directa en el líquido cefalorraquídeo. La administración intravenosa por infusión continua es un procedimiento ejemplar para administrar los anticuerpos terapéuticos de la presente invención. El compuesto terapéutico puede estar en forma de una solución, una suspensión, una emulsión, un dispositivo de infusión o un dispositivo de administración para la implantación, o puede presentarse como un polvo seco para ser
- 55 reconstituido con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. La composición puede estar en forma de píldora, tableta, cápsula, líquido o tableta de liberación sostenida para administración oral; o un líquido para administración intravenosa, intratecal, subcutánea o parenteral; o un polímero u otro vehículo de liberación sostenida para administración local.

- 60 Procedimientos bien conocidos en la técnica para hacer formulaciones se encuentran, por ejemplo, en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (20ª ed., Ed. A.R. Gennaro AR., 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia,

PA). Las formulaciones para administración parenteral pueden contener, por ejemplo, excipientes, agua estéril, solución salina, polialquilenglicoles como polietilenglicol, aceites de origen vegetal o naftalenos hidrogenados. Se puede utilizar polímero de láctido biodegradable, biocompatible, copolímero de láctido/glicólido o copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno para controlar la liberación de los compuestos. Se pueden usar formulaciones de nanopartículas (por ejemplo, nanopartículas biodegradables, nanopartículas de lípidos sólidos, liposomas) para controlar la biodistribución de los compuestos. Otros sistemas de administración potencialmente útiles incluyen partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, bombas intratecales, sistemas de infusión implantables y liposomas. La concentración del compuesto en la formulación varía dependiendo de varios factores, incluida la dosis del fármaco a administrar y la vía de administración.

10 Para administrar un compuesto de la invención mediante determinadas vías de administración, puede ser necesario recubrir o administrar conjuntamente el compuesto con material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse a un sujeto en un portador adecuado, por ejemplo, liposomas, o en un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones salinas y soluciones tampón acuosas. Los liposomas incluyen emulsiones de CGF de agua en aceite en agua, así como liposomas convencionales (Strejan et al., J. Neuroimmunol. 7:27-41, 1984). Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica y se incluye en la invención, excepto cuando cualquier medio o agente convencional es incompatible con el compuesto activo. También se pueden incorporar en las composiciones compuestos activos suplementarios.

Usualmente, las composiciones terapéuticas deben ser esterilizadas y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse en forma de solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante incorporación del compuesto activo, en la cantidad requerida, al disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes anteriormente enumerados, según sea necesario, seguida de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son secado a vacío y liofilización, que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de la solución previamente esterilizada por filtración. Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un solo bolo, pueden administrarse varias dosis divididas con el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden administrarse una o dos veces a la semana mediante inyección subcutánea o una o dos veces al mes mediante inyección subcutánea.

45 Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. Las formas de dosificación unitarias, tales como se utilizan en la presente, hacen referencia a unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar, donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado asociado con el portador farmacéutico necesario. La especificación de las formas de dosificación unitarias se estipula mediante y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y los efectos terapéuticos o profilácticos específicos que se desee alcanzar y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de la producción de dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

55 Las frases "administración parenteral" y "administrada por vía parenteral" como se usan en esta invención se refieren a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal. Ejemplos de portadores acuosos y convenientes que pueden ser empleados en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (como glicerol, glicol de propileno, glicol de polietileno y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales,

como aceite de oliva, ésteres orgánicos inyectables, como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, como por ejemplo, lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

- 5 Composiciones de la invención también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede asegurar mediante procedimientos de esterilización así como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antimicóticos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir en las composiciones agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares. Asimismo, la absorción
- 10 prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede provocarse mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monostearato de aluminio y gelatina. Cuando los compuestos de la presente invención se administran como farmacéuticos, a humanos y animales, pueden administrarse solas o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, del 0.001 a 90 % (más preferiblemente 0.005 a 70 %, como 0.01 a 30 %) de ingrediente activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.
- 15 Para administración intravenosa o intratecal o inyección directa, la composición debe ser estéril y fluida en la medida en que la composición sea entregable mediante jeringa. Además del agua, el vehículo puede ser una solución salina tamponada isotónica, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener una fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un
- 20 recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio en la composición. La absorción a largo plazo de las composiciones inyectables se puede provocar incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.
- 25 Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que se pueden usar en una forma hidratada adecuada, y / o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las
- 30 composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de los compuestos particulares de la presente invención utilizadas, o el éster, sal o amida de la misma, la vía de administración, el momento de administración, la velocidad de excreción
- 35 del compuesto particular que se utilice, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales que se utilicen en combinación con los compuestos particulares empleados, la edad, el sexo, el peso, el estado general de salud y la historia clínica del paciente que se esté tratando, así como factores similares conocidos por los expertos en la técnica médica. Un médico o veterinario con experiencia en la técnica puede determinar e indicar fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica necesaria. Por ejemplo, el médico o veterinario puede comenzar las
- 40 dosis de los compuestos de la invención empleados en la composición farmacéutica en niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta alcanzar el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la invención será la cantidad del compuesto que es la dosis eficaz más baja para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis eficaz generalmente dependerá de los factores que se describieron anteriormente. Si se desea, la dosis diaria eficaz de una composición terapéutica se
- 45 puede administrar como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado en intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas de dosificación unitaria. Si bien es posible que un compuesto de la presente invención se administre solo, es preferible administrar el compuesto como una formulación farmacéutica (composición).
- 50 Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Los expertos en la técnica conocen ejemplos de implantes, sistemas de administración y módulos bien conocidos útiles en la presente invención.

Trastornos y afecciones

- 55 Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse en cualquier situación en la que se desee inmunosupresión (por ejemplo, rechazo de trasplantes o trastornos autoinmunes). Estos anticuerpos son particularmente útiles para tratar el rechazo de trasplantes, por ejemplo, reduciendo la probabilidad de que un trasplante particular sea rechazado por el huésped o aumentando el tiempo antes de que tenga lugar el
- 60 rechazo. Los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden usar junto con el trasplante de cualquier órgano o cualquier tejido que sea adecuado para el trasplante. Los órganos ejemplares incluyen corazón, riñón,

pulmón, hígado, páncreas, intestino y timo; Los tejidos ejemplares incluyen hueso, tendón, córnea, piel, válvula cardíaca, vena y médula ósea.

- Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos también pueden usarse para tratar trastornos autoinmunes, trastornos particulares en los que los autoanticuerpos están implicados en la patogénesis de la enfermedad. Las enfermedades autoinmunes que están o pueden estar asociadas con la producción de autoanticuerpos incluyen el lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome CREST (calcinosis, síndrome de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilo y telangiectasia), opsoclonus, miopatía inflamatoria (por ejemplo, polimiositis, dermatomiositis y miositis por cuerpos de inclusión), esclerodermia sistémica, cirrosis biliar primaria, enfermedad celíaca (por ejemplo, enteropatía sensible al gluten), dermatitis herpetiforme, síndrome de Miller-Fisher, neuropatía axonal motora aguda (AMAN), neuropatía motora multifocal con bloqueo de la conducción, hepatitis autoinmune, síndrome antifosfolípido, granulomatosis de Wegener, poliangitis microscópica, síndrome de Churg-Strauss, artritis reumatoide, hepatitis autoinmune crónica, escleromiositis, miastenia gravis, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, degeneración cerebelosa paraneoplásica, síndrome de la persona rígida, encefalitis límbica, síndrome de Isaacs, corea de Sydenham, enfermedad neuropsiquiátrica autoinmune pediátrica asociada al estreptococo (PANDAS), encefalitis, diabetes mellitus tipo 1 y neuromielitis óptica.

- Otros trastornos autoinmunes incluyen anemia perniciosa, enfermedad de Addison, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis psoriásica, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso (por ejemplo, lupus eritematoso discoide, lupus eritematoso inducido por fármacos y lupus eritematoso neonatal), esclerosis múltiple y artritis reactiva.

- Los trastornos adicionales que pueden tratarse mediante los usos de la presente invención incluyen, por ejemplo, polimiositis, dermatomiositis, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, uveítis autoinmune, adrenalitis, tiroiditis, enfermedad autoinmune de la tiroides, atrofia gástrica, hepatitis crónica, hepatitis lupoide, aterosclerosis, demencia presenil, enfermedades desmielinizantes, lupus eritematoso cutáneo subagudo, hipoparatiroidismo, síndrome de Dressler, trombocitopenia autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica, pénfigo vulgar, pénfigo, pénfigo, alopecia arcata, pénfigoide, esclerodermia, esclerodermia sistémica progresiva, diabetes mellitus de comienzo en adultos (por ejemplo, diabetes tipo II), infertilidad autoinmune masculina y femenina, espondilitis anquilosante, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad del tejido conectivo mixto, poliarteritis nodosa, vasculitis necrotizante sistémica, artritis reumatoide de aparición juvenil, glomerulonefritis, dermatitis atópica, rinitis atópica, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Chagas, sarcoidosis, fiebre reumática, asma, aborto recurrente, síndrome antifosfolípido, pulmón de granjero, eritema multiforme, síndrome post cardiectomía, Síndrome de Cushing, hepatitis activa crónica autoinmune, pulmón de pájaro, enfermedad alérgica, encefalomiелitis alérgica, necrólisis epidérmica tóxica, alopecia, síndrome de Alport, alveolitis, alveolitis alérgica, alveolitis fibrosa, enfermedad pulmonar intersticial, eritema nodoso, pioderma gangrenoso, reacción a transfusiones, lepra, malaria, leishmaniasis, tripanosomiasis, arteritis de Takayasu, polimialgia reumática, arteritis temporal, esquistosomiasis, arteritis de células gigantes, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, eczema, granulomatosis linfomatosa, enfermedad de Behcet, síndrome de Caplan, enfermedad de Kawasaki, dengue, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, endoftalmitis, eritema elevatum et diutinum, eritroblastosis fetal, faciitis eosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, filariasis, ciclicidad, ciclicidad crónica, ciclicidad heterocrónica, ciclicidad de Fuch, nefropatía por IgA, púrpura de Henoch-Schonlein, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo al trasplante, infección por virus de la inmunodeficiencia humana, infección por ecovirus, cardiomiopatía, enfermedad de Alzheimer, infección por parvovirus, infección por virus de la rubéola, síndromes posteriores a la vacunación, infección por rubéola congénita, linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin, carcinoma de células renales, mieloma múltiple, síndrome de Eaton-Lambert, policondritis recurrente, melanoma maligno, crioglobulinemia, macroglobulemia de Waldenström, infección por el virus de Epstein-Barr, paperas, síndrome de Evan e insuficiencia gonadal autoinmune.

Agentes inmunodepresivos

- Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos descritos en el presente documento pueden formularse o administrarse en combinación con un inmunosupresor. Ejemplos de inmunosupresores incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de calcineurina (por ejemplo, ciclosporina A (Sandimmune®), ciclosporina G tacrolimus (Prograf®, Protopic®)), inhibidores de mTor (por ejemplo, sirolimus (Rapamune®, Neoral®), temsirolimus (Torisel®), zotarolimus y everolimus (Certican®)), fingolimod (Gilenya™), miriocina, alemtuzumab (Campath®, MabCampath®, Campath-1H®), rituximab (Rituxan®, MabThera®), un anticuerpo monoclonal antiCD4 (p.ej. HuMax-CD4), un anticuerpo monoclonal anti-LFA1 (por ejemplo, CD11a), un anticuerpo monoclonal anti-LFA3, un anticuerpo anti-CD45 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD45RB), un anticuerpo anti-CD19 (ver, por ejemplo, la Publicación de Patente de Estados Unidos 2006/0280738), monabatacept (Orencia®), belatacept, indolil-ASC (derivados de 32-indol éter de tacrolimus y ascomicina), azatioprina (Azasan®, Imuran®), inmunoglobulina linfocitaria y globulina antitímocítica [equina] (Atgam®), micofenolato mofetil (Cellcept®), micofenolato sódico (myfortic®), daclizumab (Zenapax®), basiliximab (Simulect®), ciclofosfamida (Endoxan®, Cytosan®, Neosar™, Revyrunx™, Revimmune™), prednisona, prednisolona, leflunomida (Arava®), FK778, FK779, 15-

deoxispergualina (DSG), busulfan (Myleran[®], Busulfex[®]), fludarabina (Fludara[®]), metotrexato (Rheumatrex[®], Trexall[®]), 6-mercaptopurina (Purinethol[®]), 15-deoxispergualinae (Gusperimus), LF15-0195, bredinina, brequinar y muromonab-CD3 (Orthoclone[®]).

- 5 Los procedimientos para evaluar la actividad inmunosupresora de un agente son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la duración del tiempo de supervivencia del órgano trasplantado in vivo con y sin intervención farmacológica sirve como medida cuantitativa para la supresión de la respuesta inmune. También se pueden usar ensayos in vitro, por ejemplo, un ensayo de reacción mixta de linfocitos (MLR) (ver, por ejemplo, Fathman et al., J. Immunol 118:1232-8, 1977); un ensayo de CD3 (activación específica de células inmunitarias a través de un anticuerpo anti-CD3 (por ejemplo, OKT3)) (ver, por ejemplo, Khanna et al., Transplantation 67:882-9, 1999; Khanna et al. (1999) Transplantation 67:S58); y un ensayo de IL-2R (activación específica de células inmunes con la citoquina IL-2 agregada exógenamente) (ver, por ejemplo, Farrar et al., J. Immunol. 126:1120-5, 1981).

- Ciclosporina A (CsA; CAS N.º 59865-13-3; Patente de Estados Unidos N.º 3.737.433) y sus análogos se pueden usar como un inmunosupresor. Se conocen varias otras ciclosporinas y sus derivados y análogos que exhiben actividad inmunosupresora. Las ciclosporinas y sus formulaciones se describen, por ejemplo, en 2004 Physicians' Desk Reference[®] (2003) Thomson Healthcare, 58ª ed., y Patentes de Estados Unidos N.º 5.766.629; 5.827.822; 4.220.641; 4.639.434; 4.289.851; 4.384.996; 5.047.396; 4.388.307; 4.970.076; 4.990.337; 4.822.618; 4.576.284; 5.120.710; y 4.894.235.

- 20 Tacrolimus (FK506) es un macrólido que ejerce efectos muy similares a los de la CsA, tanto en lo que respecta a su modo de acción molecular como a su eficacia clínica (Liu, Immunol. Today 14:290-5, 1993; Schreiber et al., Immunol. Today, 13:136-42, 1992); sin embargo, estos efectos se muestran en dosis de 20 a 100 veces más bajas que la CsA (Peters et al., Drugs 46: 746-94, 1993). El tacrolimus y sus formulaciones se describen, por ejemplo, en 2004 Physicians' Desk Reference[®] (2003) Thomson Healthcare, 58ª ed., y las patentes N.º 4.894.366; 4.929.611; y 5.164.495.

- Sirolimus (rapamicina) es un macrólido de lactama inmunosupresor, por ejemplo, por *Streptomyces hygroscopicus*. Se conocen y describen numerosos derivados de sirolimus y sus análogos y sus formulaciones, por ejemplo, en el 2004 Physicians' Desk Reference[®] (2003) Thomson Healthcare, 58ª ed., Patente Europea EP 0467606; Publicaciones PCT N.º WO 94/02136, WO 94/09010, WO 92/05179, WO 93/11130, WO 94/02385, WO 95/14023 y WO 94/02136y las patentes de Estados Unidos N.º 5.023.262; 5.120.725; 5.120.727; 5.177.203; 5.258.389; 5.118.677; 5.118.678; 5.100.883; 5.151.413; 5.120.842; y 5.256.790.

35 Fragmentos CD40

- También se describen fragmentos de CD40 que incluyen el epítipo que está unido específicamente por el anticuerpo 2C10. El anticuerpo 2C10 se generó contra la parte extracelular del polipéptido CD40; por lo tanto, se cree que este anticuerpo reacciona con una parte de esta secuencia (SEQ ID NOS:5 y 6).

- 40 Por lo tanto, la descripción proporciona fragmentos CD40 (por ejemplo, menos de 150, 120, 100, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 18, 15, 12, 11, 10, 9, 8 o 7) aminoácidos de longitud que están específicamente unidos por el anticuerpo 2C10. En cierta divulgación, el fragmento es de 8-10, 8-12, 8-15, 8-20, 8-30, 8-40, 8-50, 8-60, 8-70, 8-80, u 8 100 aminoácidos de longitud. En otra divulgación, el fragmento es de 7-10, 7-12, 7-15, 7-20, 7-30, 7-40, 7-50, 7-60, 7-70, 7-80 o 7- 100 de longitud.

Proteínas de fusión

- También se describe una proteína de fusión que incluye un fragmento descrito en el presente documento y una secuencia heteróloga. En una cierta descripción, una de las parejas de fusión es la proteína Fc (por ejemplo, Fc de ratón o Fc humana). La fusión también puede ser una secuencia útil para la producción de anticuerpos, por ejemplo, una proteína de unión a maltosa o GST. En otra descripción, la proteína de fusión es una etiqueta de purificación o detección, por ejemplo, proteínas que pueden detectarse directa o indirectamente, como la proteína verde fluorescente, la hemaglutinina o la fosfatasa alcalina, los dominios de unión al ADN (por ejemplo, GAL4 o LexA), dominios de activación de genes (por ejemplo, GAL4 o VP16), etiquetas de purificación o péptidos de señal de secreción (por ejemplo, secuencia de señales de preprotripsina). En otra descripción, la pareja de fusión puede ser una etiqueta, tal como c-myc, poli histidina o FLAG. Cada pareja de fusión puede contener uno o más dominios, por ejemplo, una secuencia de señal de preprotripsina y una etiqueta FLAG.

60 Producción de fragmentos CD40 y proteínas de fusión.

Los fragmentos de CD40 y las proteínas de fusión descritas en el presente documento pueden producirse por transformación de una célula huésped adecuada con una molécula de polinucleótido que codifica el fragmento de polipéptido o proteína de fusión en un vehículo de expresión adecuado.

- 5 Los expertos en el campo de la biología molecular entenderán que se puede usar cualquiera de una amplia variedad de sistemas de expresión y que el sistema preciso o la célula huésped utilizada no es fundamental. Los sistemas de expresión ejemplares incluyen huéspedes procarióticos (por ejemplo, *E. coli*) y huéspedes eucariotas (por ejemplo, *S. cerevisiae*, células de insecto, por ejemplo, células Sf21 o células de mamíferos, por ejemplo, NIH 3T3, HeLa, o preferiblemente células COS). Dichas células están disponibles en una amplia gama de fuentes (por ejemplo, la
- 10 American Type Culture Collection, Manassas, VA). El procedimiento de transformación o transfección y la elección del vehículo de expresión dependerán del sistema anfitrión seleccionado. Los procedimientos de transformación y transfección se describen, por ejemplo, en Kuchelapati et al. (CRC Crit. Rev. Biochem. 16:349-379, 1982) y en DNA Transfer to Cultured Cells (eds., Ravid y Freshney, Wiley-Liss, 1998); y los vehículos de expresión se pueden elegir de entre aquellos proporcionados, por ejemplo, en Vectors: Expression Systems: Essential Techniques (ed., Jones,
- 15 Wiley & Sons Ltd., 1998).

- Una vez que el fragmento polipeptídico CD40 recombinante o la proteína de fusión se expresan, se puede aislar, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad. En un ejemplo, un anticuerpo generado contra el fragmento o la proteína de fusión (por ejemplo, el anticuerpo 2C10) puede unirse a una columna y usarse para aislar el fragmento polipeptídico
- 20 o la proteína de fusión. La lisis y el fraccionamiento de las células que albergan fragmentos o proteínas de fusión antes de la cromatografía de afinidad se pueden realizar mediante procedimientos estándar (ver, por ejemplo, Methods in Enzymology, volumen 182, eds., Abelson, Simon, y Deutscher, Elsevier, 1990).

- Una vez aislado, el fragmento polipeptídico CD40 o la proteína de fusión pueden, si se desea, purificarse más, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (ver, por ejemplo, Fisher, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, eds., Work and Burdon, Elsevier, 1980; y Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Tercera Edición, ed., Cantor, Springer, 1994).
- 25

- Los fragmentos de polipéptidos CD40 o las proteínas de fusión también pueden producirse por síntesis química (por ejemplo, por los procedimientos descritos en Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª ed., 1984, The Pierce Chemical Co., Rockford, IL; y Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide, ed., Kates y Albericio, Marcel Dekker Inc., 2000).
- 30

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a CD40, que comprende una región variable de cadena pesada, que comprende todas las regiones hipervariables correspondientes a las establecidas en los aminoácidos 20-132 de la SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera que comprende todas las regiones hipervariables correspondientes a las expuestas en los aminoácidos 23-128 de la SEQ ID NO: 4, donde dicho anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno bloquea la activación de linfocitos B por células Jurkat que expresan CD154 *in vitro*.
2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, donde dicho CD40 es rhesus CD40 o CD40 humano.
3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 o 2, donde dicho fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo que carece de la porción Fc o es un F (ab')₂, un Fab, un Fv, o una estructura scFv.
4. Un polinucleótido que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde, opcionalmente, el polinucleótido es un vector que codifica dicho polinucleótido.
5. Una célula que comprende el polinucleótido de la reivindicación 4, donde, opcionalmente, dicha célula es una célula procariótica o una célula eucariota, tal como una célula de mamífero.
6. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para uso en la supresión del sistema inmune en un sujeto.
7. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para uso en el tratamiento o tratamiento profiláctico de rechazo de trasplante o para aumento de la duración del tiempo antes de que ocurra el rechazo de trasplante en un sujeto que lo necesite.
8. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso según la reivindicación 6 o 7, donde dicho sujeto ha recibido, o necesita un trasplante de órgano, en particular en el que dicho órgano se selecciona del grupo que consiste en corazón, riñón, pulmón, hígado, páncreas, intestino y timo, o una porción de los mismos; o donde dicho sujeto ha recibido, o necesita un trasplante de tejido, en particular donde dicho tejido es hueso, tendón, córnea, piel, válvula cardíaca, vena o médula ósea.
9. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para uso según la reivindicación 8, donde:
 - a) dicho sujeto necesita dicho trasplante de órgano o dicho trasplante de tejido; o
 - b) dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se formula para su administración en un régimen de tratamiento durante al menos un mes después de dicho trasplante de órgano o dicho trasplante de tejido, en particular donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se formula para su administración en un régimen de tratamiento durante al menos seis meses después de dicho trasplante de órgano o dicho trasplante de tejido.
10. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para uso en un procedimiento para tratar o tratar profilácticamente la enfermedad de injerto contra huésped en un sujeto que lo necesite.
11. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para usar en un procedimiento para tratar o tratar profilácticamente un trastorno autoinmune en un sujeto que lo necesite.
12. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para uso según la reivindicación 11, donde dicho trastorno autoinmune es:
 - a) asociado con o causado por la presencia de un autoanticuerpo;
 - b) seleccionado del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome CREST (calcinosis, síndrome de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilo y telangiectasia), opsoclonus, miopatía inflamatoria (por ejemplo, polimiositis, dermatomiositis y miositis por cuerpos de inclusión), esclerodermia sistémica, cirrosis biliar primaria, enfermedad celíaca (por ejemplo, enteropatía sensible al gluten), dermatitis herpetiforme, síndrome de Miller-Fisher, neuropatía axonal motora aguda (AMAN), neuropatía motora multifocal con bloqueo de la conducción, hepatitis autoinmune, síndrome antifosfolípido, granulomatosis de Wegener, poliangeitis microscópica, síndrome de Churg-Strauss, artritis reumatoide, hepatitis autoinmune crónica, escleromiositis, miastenia gravis, síndrome miasténico de

Lambert-Eaton, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, degeneración cerebelosa paraneoplásica, síndrome de la persona rígida, síndrome de Isaacs, corea de Sydenham, enfermedad neuropsiquiátrica autoinmune pediátrica asociada al estreptococo (PANDAS), diabetes mellitus tipo 1 y neuromielitis óptica; o

- 5 c) seleccionado del grupo que consiste en anemia perniciosa, enfermedad de Addison, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis psoriásica, síndrome de Sjogren, lupus eritematoso (por ejemplo, lupus eritematoso discoide, lupus eritematoso inducido por fármacos y lupus eritematoso neonatal), esclerosis múltiple y artritis reactiva.

13. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 6-12,

10

- a) donde dicho sujeto es un mamífero, en particular donde dicho sujeto es un ser humano;
b) donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se formula para administración parenteral, intravenosa, subcutánea, oral, tópica, intratecal o local; o

c) donde dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se formula para su administración en un régimen de

15 tratamiento con un segundo agente, como la administración dentro de los seis meses siguientes a dicho anticuerpo o

fragmento de unión al antígeno, donde dicho segundo agente es un inmunosupresor, en particular, donde dicho segundo agente se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de la calcineurina, tacrolimus, un inhibidor de mTor, fingolimod, miriocina, alemtuzumab, rituximab, un anticuerpo monoclonal anti-CD4, un anticuerpo monoclonal anti-LFA1, un anticuerpo monoclonal anti-LFA3, un anticuerpo anti-CD45, un anticuerpo anti-CD19, monabatacept,

20 belatacept, indolilo-ASC; azatioprina, inmunoglobulina linfocitaria y globulina antitímocítica equina, micofenolato mofetil, micofenolato sódico, daclizumab, basiliximab, ciclofosfamida, prednisona, prednisolona, leflunomida, FK778, FK779, busulfán, fludarabina, metotrexato, 6-mercaptopurina, 15-deoxispergualina, LF15-0195, bredinina, brequinar y muromonab-CD3, donde opcionalmente,

25 i) dicho inhibidor de calcineurina es ciclosporina A o ciclosporina G;

ii) dicho inhibidor de mTor es sirolimus, temsirolimus, zotarolimus o everolimus;

iii) dicho anticuerpo anti-CD45 es un anticuerpo anti-CD45RB; o

iv) dicho segundo agente es belatacept.

30 14. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para uso según la reivindicación 13, en el que dicho régimen de tratamiento comprende la administración de dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo dentro de una semana o un mes del segundo agente.

Descripción: Clon 2C10 anti-CD40 ratón

Cadena pesada (péptido señal + región V)

ATGGAAAGGCACTGGATCTTTCTCTTCCTGTTGTCAGTAACTGCAGGTGTCCAC
TCCAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAAACCTGGGGCCT
CAGTGAAGATGTCCTGTAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAACTACTGGATGC
ACTGGGTAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAAT
CCTAGCAATGATTATACTAAGTACAATCAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTG
ACTGCAGACAAATCCTCCAACACAGCCTACATGCAACTGGGTAGCCTGACATCT
GAGGACTCTGCAGTCTATTATTGTGCAAGACAGGGGTTTCCTTACTGGGGCCA
AGGGACTCTGGTCACTGTCTCT

Proteína

MERHWIFLFLSVTAGVHSQVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYFTNYW
MHWVKQRPQGQGLEWIGYINPSNDYTKYNQKFKDKATLTADKSSNTAYMQLGSL
TSEDSAVYYCARQGFPYWGQGTLVTVS

Cadena ligera (péptido señal + región V)

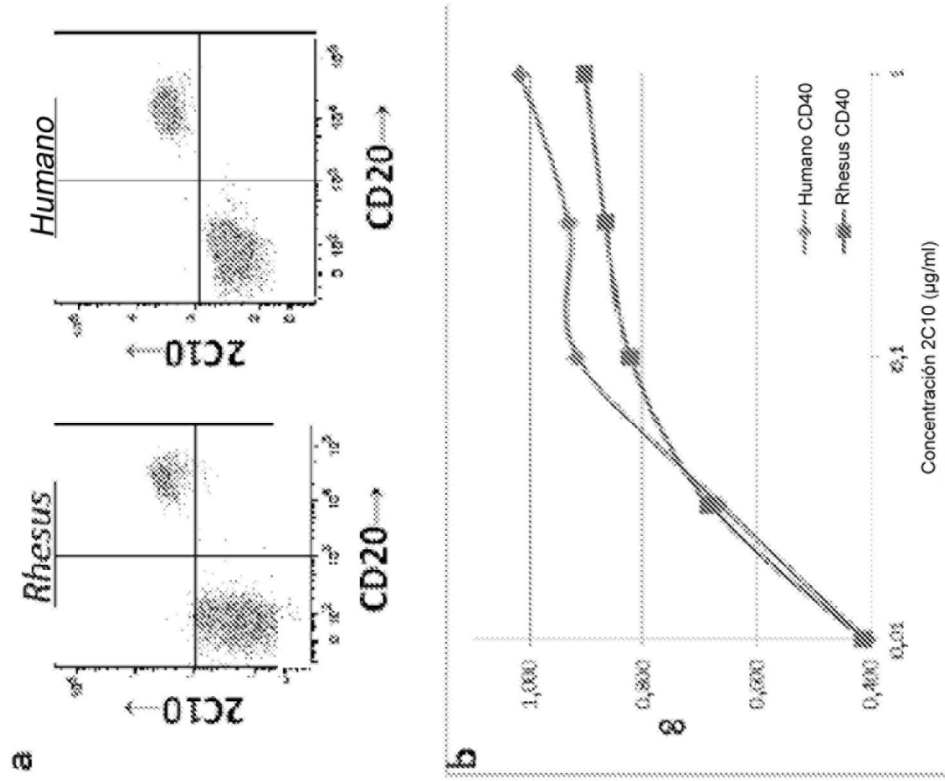
ADN

ATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAA
TATCCAGAGGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCC
AGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGC
ACTGGTACCACCAGAGGTCAGGCACCTCCCCCAAAGATGGATTTATGACACA
TCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGAC
CTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTAC
TGCCACCAGTTGAGTAGTGACCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGA
AATAAAA

Proteína

MDFQVQIFSFLLISASVIISRGQIVLTQSPAIMASPGEKVTMTCSASSSVSYMHW
YHQRSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQL
SSDPFTFGSGTKLEIK

Figura 1



Figuras 2A-2B

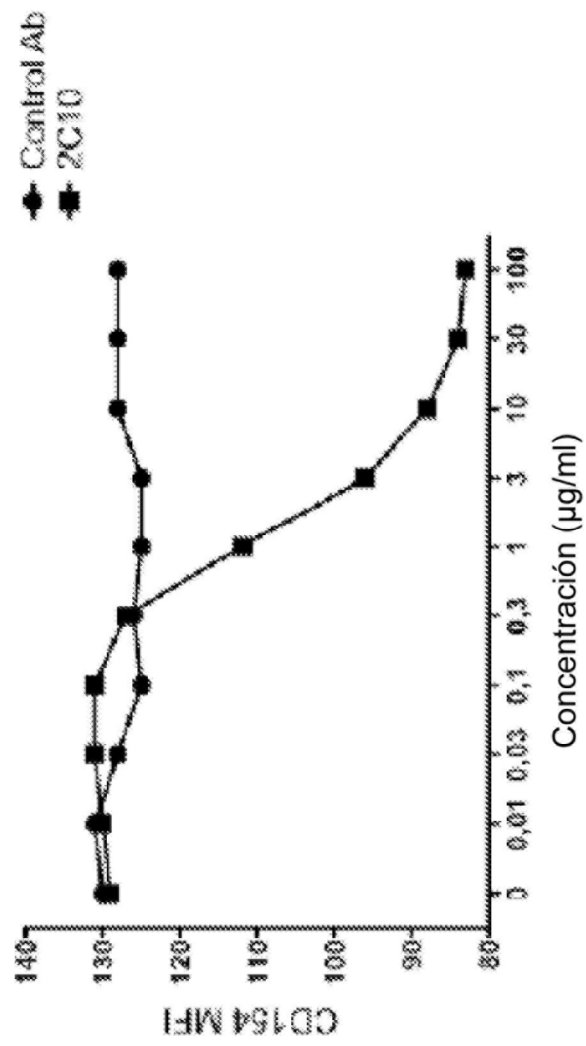
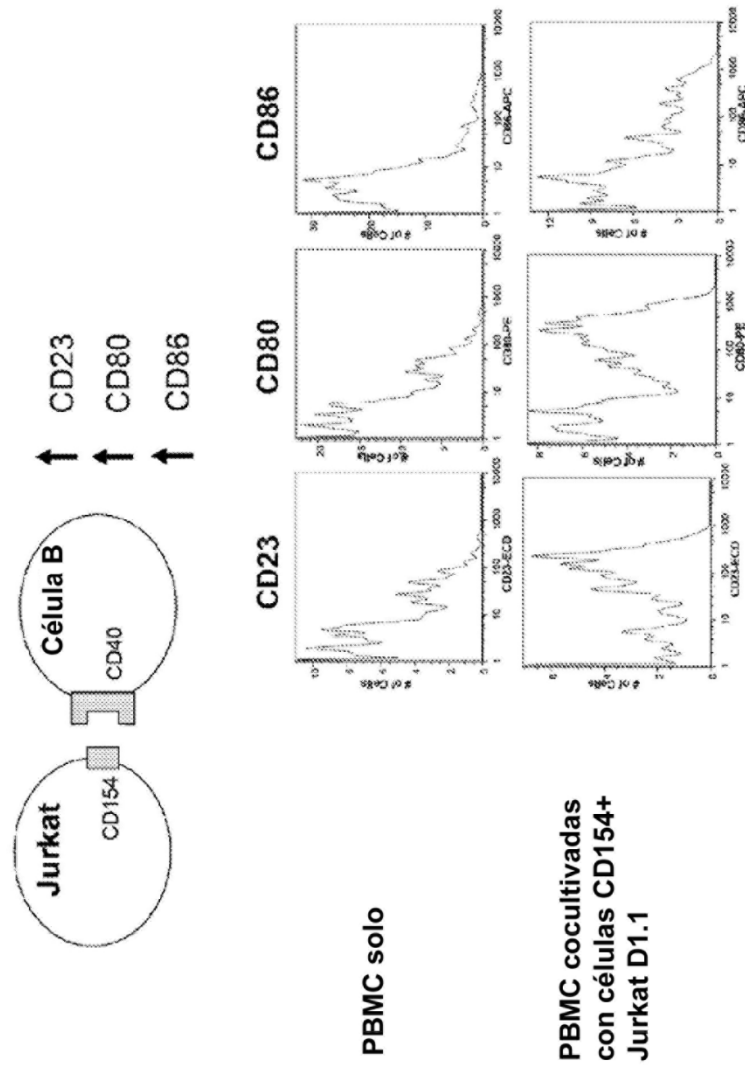


Figura 3

Principio de ensayo:

- Co-cultivo rhesus o PBMC humanas con células CD 154+ Jurkat D1.1
- CD154 activa las células B en PBMC a través de CD40
- Se leyó un cambio en la expresión de CD23, CD80 y CD86 en células B



Células CD20+ separadas

Figura 4

PBMC Rhesus

Expresión de CD23 en células B después de la activación a través de CD154
(co-cultivo Jurkat)

Bloqueo de la expresión de CD23 inducida por CD154 por co-cultivo en presencia del anticuerpo indicado

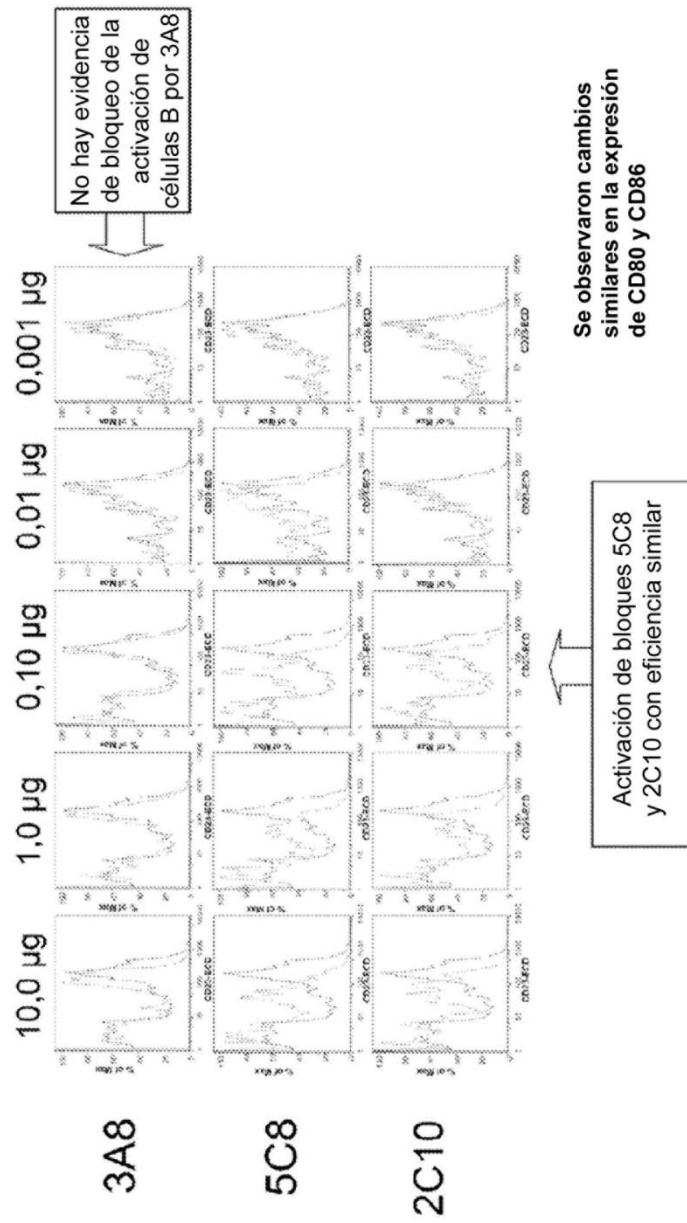


Figura 5

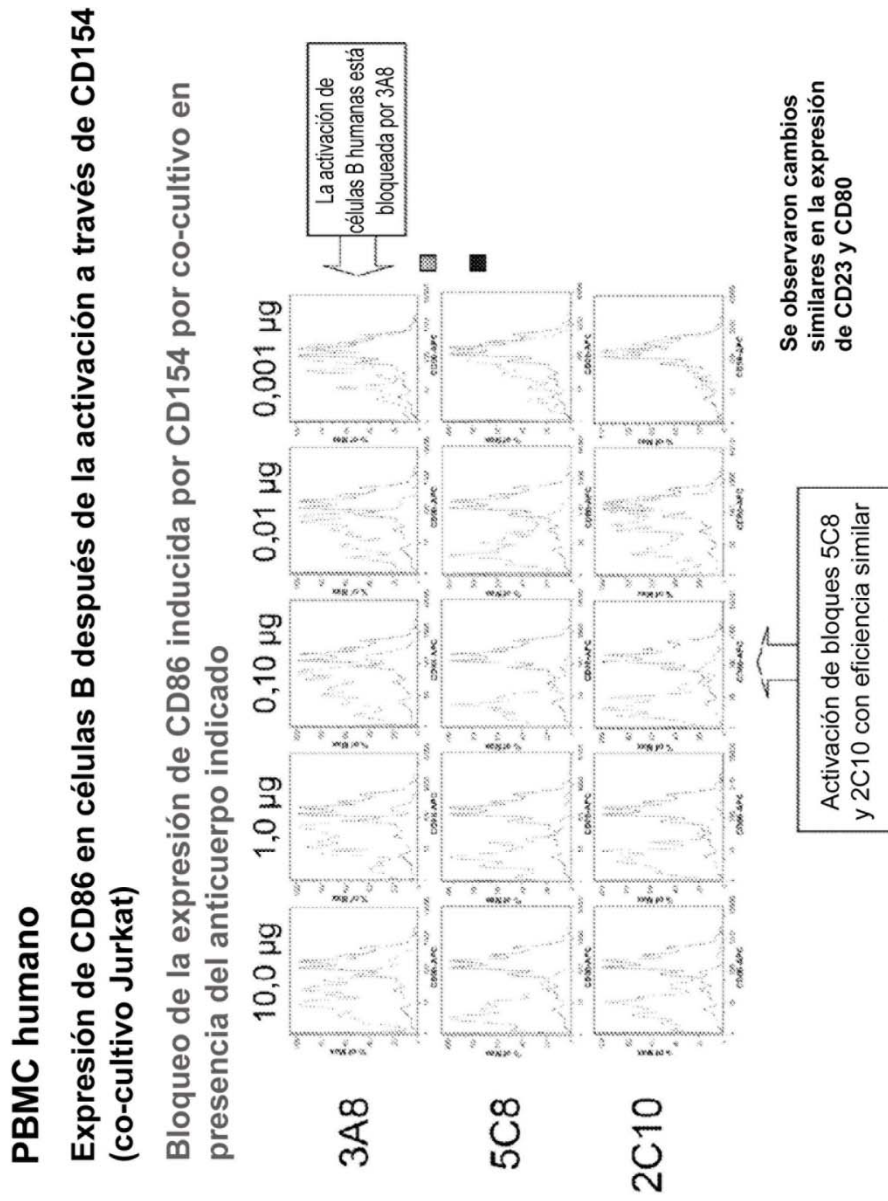


Figura 6

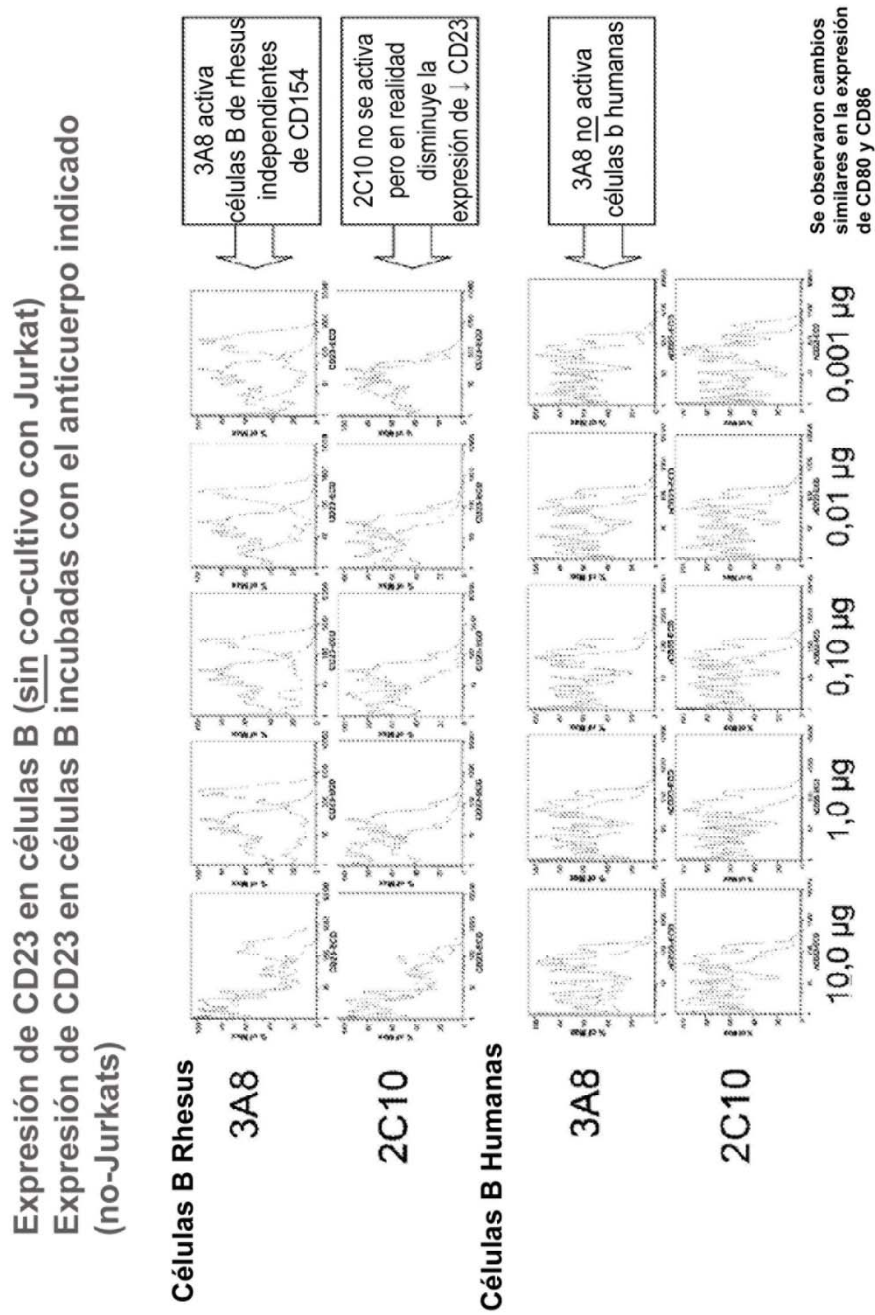


Figura 7

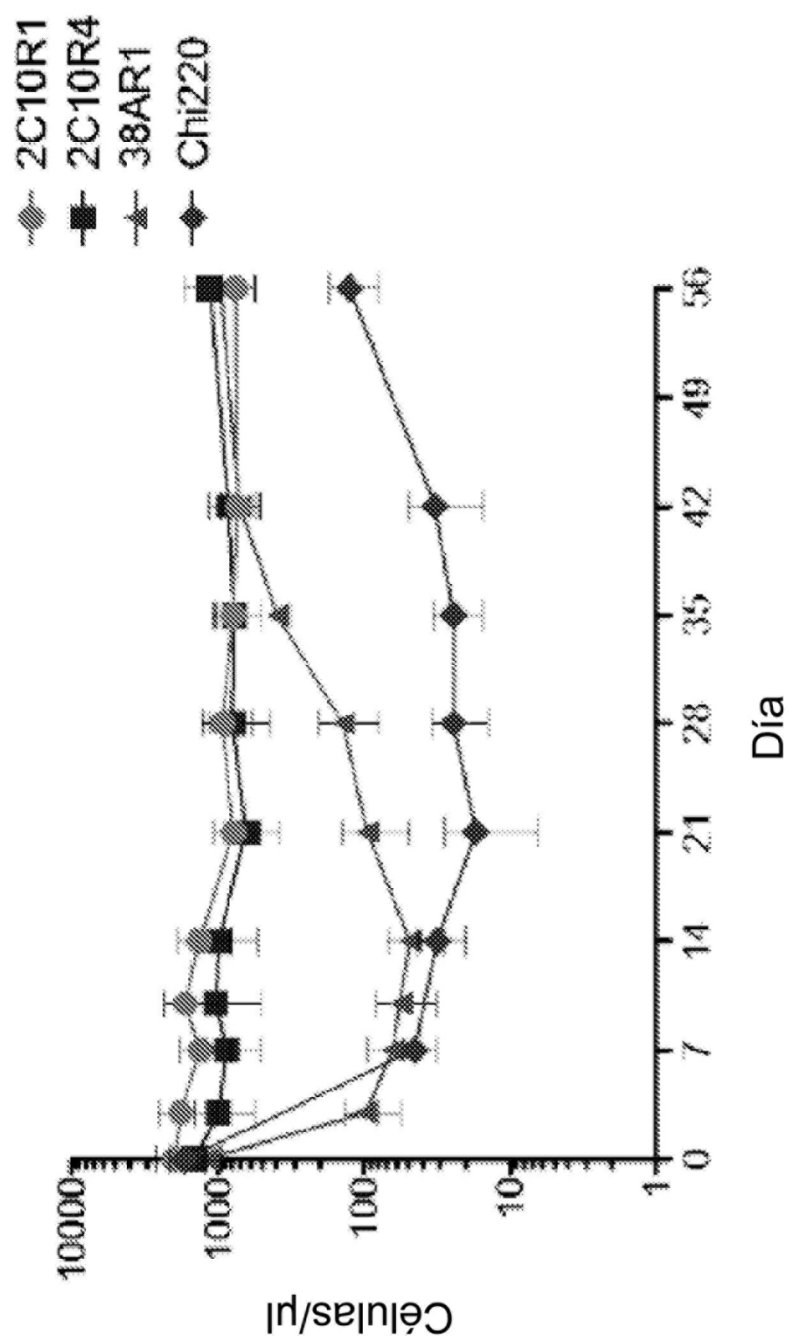


Figura 8

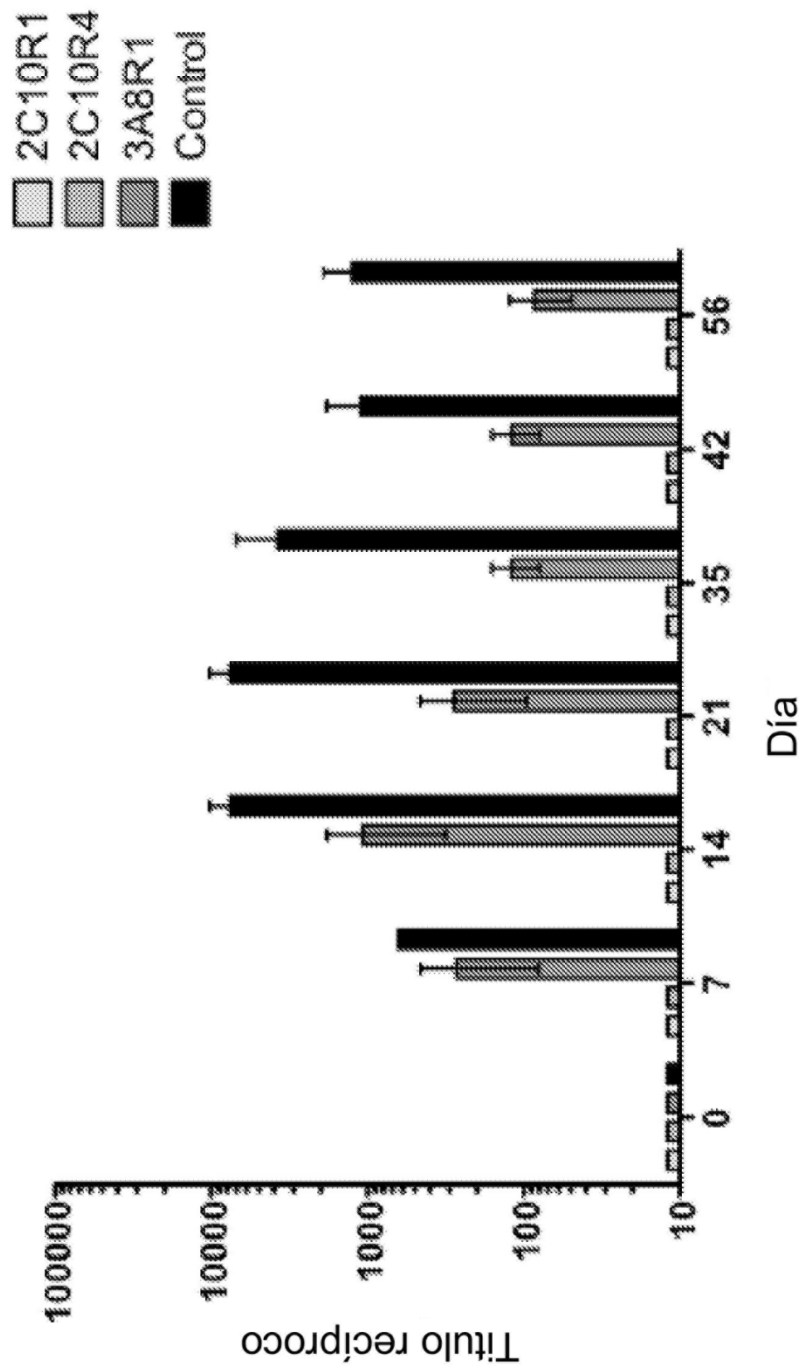


Figura 9

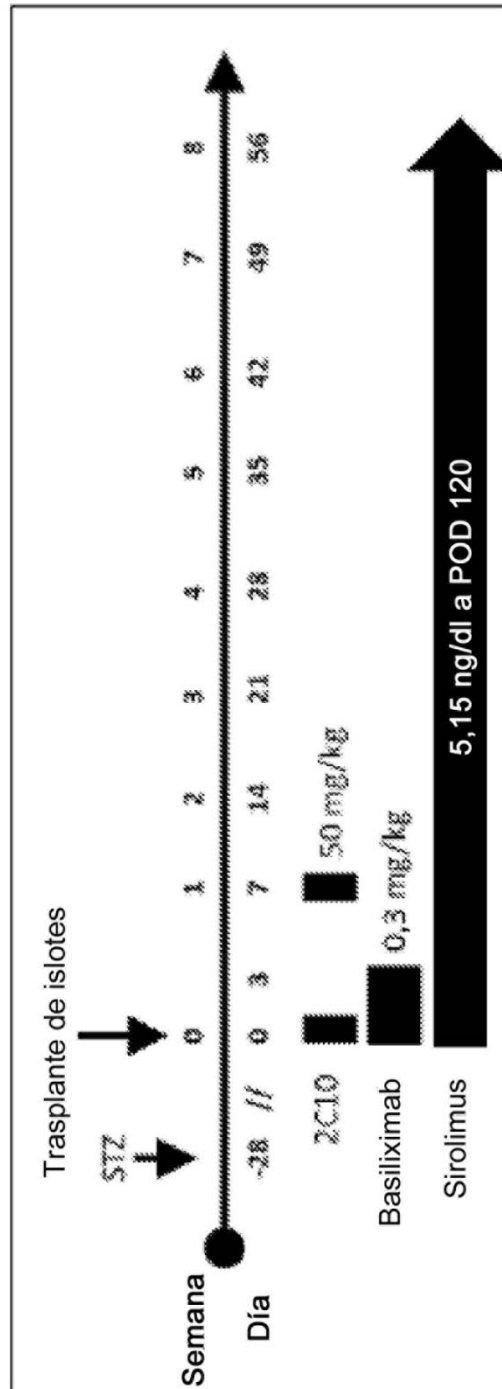
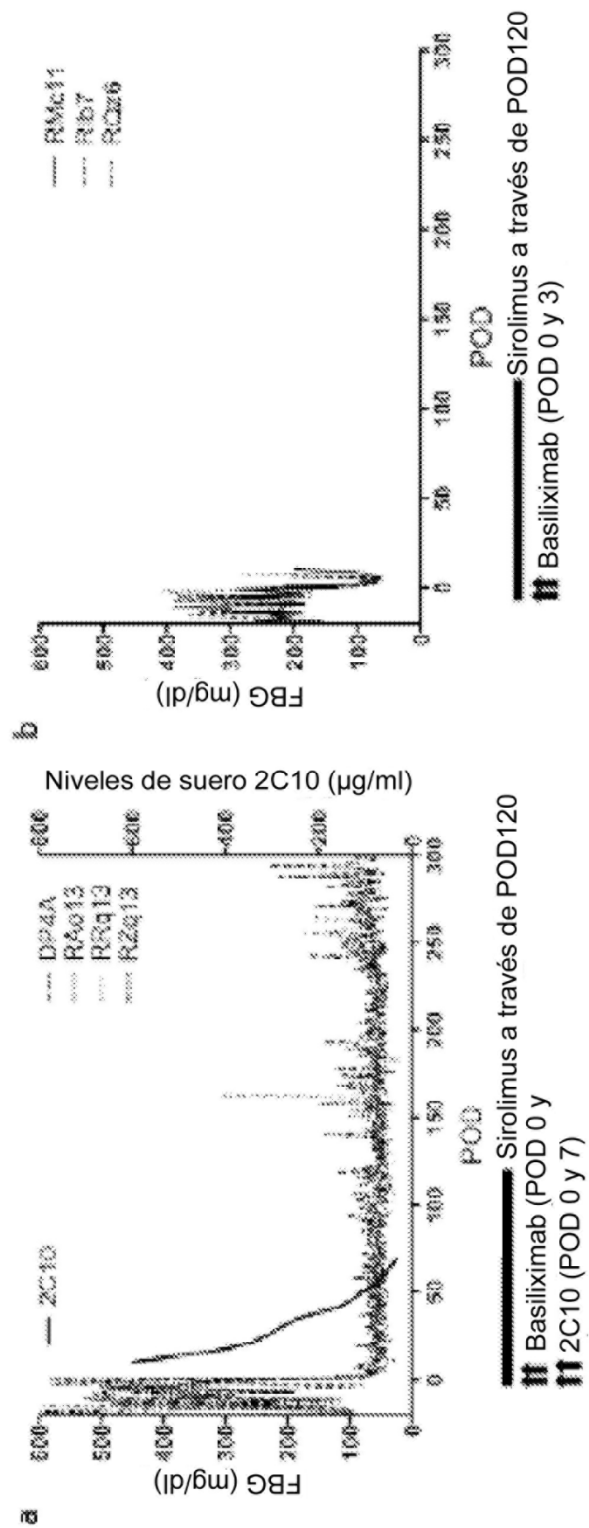


Figura 10



Figuras 11A-11B

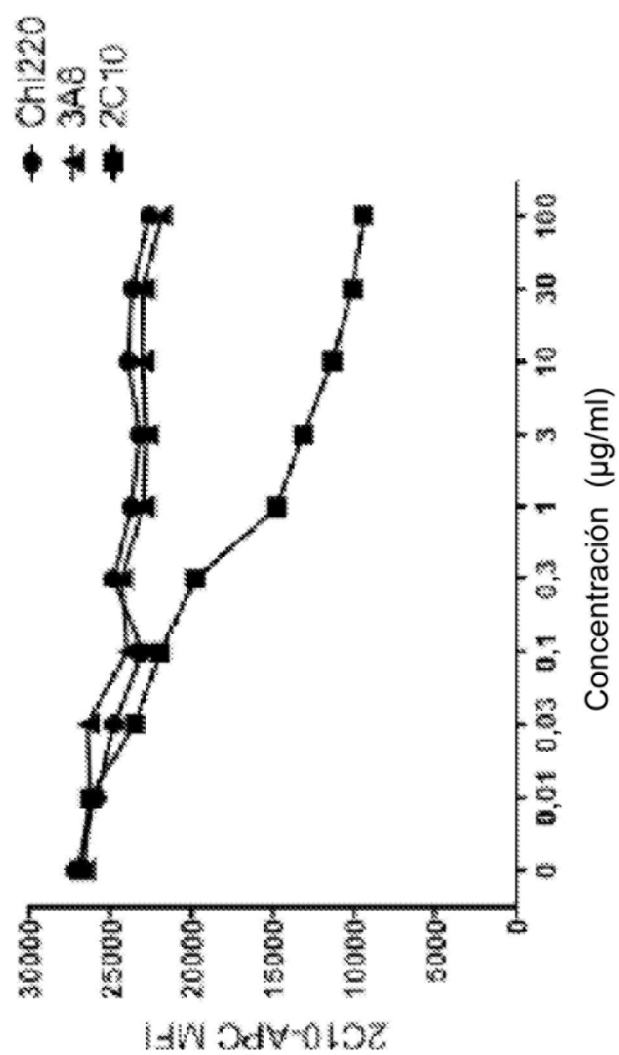


Figura 12