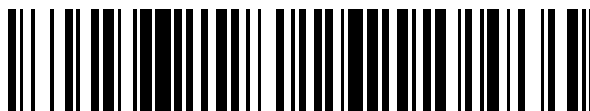


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 016**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2016** **PCT/US2016/034716**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016** **WO16196314**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2016** **E 16728520 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019** **EP 3303395**

54 Título: **Anticuerpos anti-cd40 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

29.05.2015 US 201562168425 P

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

16.07.2020

73 Titular/es:

**ABBVIE INC. (100.0%)
1 North Waukegan Road
North Chicago, IL 60064, US**

72 Inventor/es:

**BENATUIL, LORENZO;
ARGIRIADI, MARIA, A.;
MCRAE, BRADFORD, L.;
HSIEH, CHUNG-MING;
EGAN, DAVID A.;
HARLAN, JOHN E.;
JUDGE, RUSSELL A.;
WANG, RUI y
KINGSBURY, GILLIAN A.**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 774 016 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 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos CD40 (CD40).

Antecedentes de la invención

10

CD40 es un miembro de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) que desempeña un papel importante en el desarrollo de las células B, la activación de linfocitos y la función de las células presentadoras de antígeno (APC). La expresión de CD40 en el epitelio, los leucocitos y el endotelio vascular se eleva en las enfermedades autoinmunes específicas de órganos, así como en la autoinmunidad sistémica tal como el lupus eritematoso sistémico (SLE). La interrupción de la vía de señalización CD40L/CD40 reduce la producción de citocinas proinflamatorias tal como IL-23 y TNF, reduce la diferenciación y función de las células T auxiliares e inhibe la activación de macrófagos en pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas tal como la enfermedad de Crohn. La interacción de CD40 con CD40L induce respuestas inmunes tanto humores como mediadas por células. CD40 regula este par ligando-receptor para activar las células B y otras células presentadoras de antígeno (APC), incluidas las células dendríticas (DC).

15

20

25

30

35

40

CD40 es una proteína transmembrana tipo I de 48 kDa (van Kooten, J Leukoc Biol. 2000 enero;67(1):2-17) que se expresa en un amplio intervalo de tipos de células hematopoyéticas (linfocitos, monocitos, células dendríticas) y no hematopoyéticas (epitelio, endotelio, fibroblastos). CD40L se expresa principalmente en células T activadas, células B y plaquetas. Gran parte de la comprensión de la biología de CD40/CD40L proviene de la interacción entre APC (expresión de CD40 en células dendríticas (DC) o células B) y células T que expresan CD40L. En las células B en reposo, el acoplamiento de CD40L conduce a la activación, la proliferación de las células B y el desarrollo de células B de memoria (Kehry, Immunol. 1 de abril de 1996; 156 (7): 2345-8). La señalización de CD40 también se requiere para el cambio de clase de inmunoglobulina y la formación del centro germinal. La importancia de la vía de señalización de CD40/CD40L en la biología de las células B es evidente en ratones con deficiencia de CD40 o CD40L que carecen de centros germinales y se suprimen las respuestas de anticuerpos dependientes de T. Sin embargo, las respuestas de IgG independientes de T permanecen intactas en ratones CD40^{-/-} lo que sugiere que es la interacción célula-célula lo que falta en estos ratones. Los ratones con deficiencia de CD40 también tienen déficits en el compartimento de células T. La señalización a través de CD40 en las células dendríticas regula al alza el MHC de clase II, así como a varias moléculas coestimuladoras, tal como CD80 y CD86, y promueve la maduración de DC. Las DC maduras estimulan la activación y la supervivencia de las células T CD4⁺ a través de la producción de citocinas tales como IL-2 e IL-12. El cebado ineficiente de células T parece ser la causa principal de respuestas humores dependientes de T comprometidas en ratones CD40L^{-/-} (Grewal, Nature. 7 de diciembre de 1995; 378(6557):617-20). Se puede observar un fenotipo similar de células B en humanos con síndrome de hiper IgM ligado al cromosoma X. Estos pacientes sufren de inmunodeficiencia primaria debido a mutaciones en el locus de CD40L que anula la señalización de CD40/CD40L. Estos individuos tienen niveles elevados de IgM y no pueden producir IgA, IgE e IgG, lo que resulta en un riesgo aumentado de infecciones oportunistas (Adriana, J Clin Immunol. Mayo de 2008; 28 Suppl 1: S62-6).

45

50

55

La vía de señalización de CD40 es fundamental para la conversión de linfocitos y APC en reposo o naive a un fenotipo activado/maduro. Aunque el cebado de células T y la activación de células B pueden ocurrir en ausencia de señalización de CD40/CD40L, esta vía es necesaria para generar una respuesta inmune adaptativa robusta. El acoplamiento de CD40 por CD40L resulta en el reclutamiento de factores asociados al receptor de TNF (TRAF) en el dominio citoplasmático de CD40 (Bishop, Adv Exp Med Biol. 2007; 597: 131-51). La fosforilación de varias proteínas TRAF resulta en la activación de las vías de NFκB tanto canónicas como no canónicas. Además, la asociación de JAK3 con la cola citoplasmática de CD40 resulta en la activación de STAT5 que induce la maduración de DC así como la producción de TNF e IFNγ. La activación de PI3K dependiente de TRAF6 es una señal de supervivencia crítica en DC, mientras que TRAF2/TRAF6 tienen funciones redundantes en la activación de NFκB y la regulación positiva de la expresión de CD80 (Hostager, J Biol Chem. 2003 14 de noviembre; 278 (46): 45382-90). Se ha demostrado que las TRAF 2, 3, 5 y 6 desempeñan un papel importante en el cambio de clase de inmunoglobulina mediado por la señalización de CD40 (Leo, Proc Natl Acad Sci US A. 16 de febrero de 1999; 96 (4): 1421-1426).

60

La vía de señalización de CD40/CD40L se ha implicado en la patogénesis de muchas enfermedades autoinmunes, como lupus eritematoso sistémico (SLE), enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), esclerosis múltiple, artritis reumatoide y síndrome de Sjogren (Law and Grewal, Adv Exp Med Biol. 2009 ; 647: 8-36). La expresión de CD40 se eleva en macrófagos, endotelio, epitelio y células B en tejidos dañados por autoinmunidad crónica, incluidos riñón, intestino y articulaciones (Borcherding, Am J Pathol. Abril de 2010; 176 (4): 1816-27; Sawada-Hase, Am J Gastroenterol. 2000 de junio; 95 (6): 1516-23). El CD40L soluble se eleva en pacientes que sufren SLE, IBD y síndrome de Sjogren, lo que es compatible con la carga inflamatoria en estos pacientes.

65

Algunas de las primeras pruebas de la vía de CD40/CD40L en la inflamación intestinal crónica provienen de modelos preclínicos donde los mAbs anti-CD40L protegieron a los roedores de la colitis experimental (de Jong, Gastroenterology. Septiembre de 2000; 119 (3): 715-23; Liu, J. Immunol. 2000 1 de junio; 164 (11): 6005-14; Stuber, J Exp Med 1996 1 de

febrero de 183 (2): 693-8). La reducción en los puntajes de actividad de la enfermedad se asoció con la producción reducida de citocinas proinflamatorias en el intestino y la protección contra la pérdida crónica de peso corporal. Se observaron resultados similares en animales que eran genéticamente deficientes para CD40 o CD40L (de Jong, Gastroenterology. Septiembre de 2000; 119 (3): 715-23). El tratamiento de ratones con mAbs anti-CD40L después del inicio de la enfermedad sigue siendo eficaz para reducir la actividad de la enfermedad, lo que sugiere que esta vía es crítica para el mantenimiento de la enfermedad inflamatoria crónica. Además, los anticuerpos agonistas de CD40 son suficientes para impulsar la inflamación intestinal en ratones que carecen de linfocitos (Uhlir, Inmunidad. Agosto de 2006; 25 (2): 309-18). Los datos más recientes que usan siARN de CD40 también apuntan a un papel importante para la señalización de CD40 en la colitis (Arranz, J Control Release. 10 de febrero de 2013; 165 (3): 163-72). En la enfermedad de Crohn, los monocitos de la lámina propia y el epitelio expresan altos niveles de CD40 y los monocitos CD40+ están enriquecidos en la sangre periférica. Además, los polimorfismos en el locus *CD40* se han relacionado con una mayor susceptibilidad a la IBD. En los pacientes de Crohn tratados con anticuerpos anti-TNF, el perfil transcripcional indica que los niveles de ARNm de CD40 disminuyen en pacientes con una respuesta adecuada al tratamiento farmacológico. Sin embargo, en pacientes con una respuesta deficiente a los inhibidores de TNF, los niveles de ARNm de CD40 no cambian, lo que sugiere que las vías dependientes de CD40 e independientes de TNF pueden promover la inflamación en estos pacientes. Los estudios sugieren que la inhibición de la señalización mediada por CD40 es importante en la patogénesis de la IBD, así como en otras enfermedades autoinmunes. En consecuencia, sigue existiendo una necesidad de anticuerpos antagonistas anti-CD40, y porciones de unión a antígeno de los mismos, que pueden usarse con fines terapéuticos para tratar enfermedades y trastornos inflamatorios crónicos, tal como la enfermedad de Crohn.

El documento WO 2011/123489 describe anticuerpos antagonistas anti-CD40 humanizados y métodos y composiciones terapéuticas y de diagnóstico para usar los mismos.

El documento US 2004/120948 describe un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, que actúa de forma agonista o antagonista sobre CD40.

El documento WO 2007/124299 describe composiciones farmacéuticas líquidas estables que comprenden un anticuerpo antagonista anti-CD40.

Resumen de la invención

Esta invención se refiere a anticuerpos antagonistas anti-CD40. Los anticuerpos de las invenciones son anticuerpos humanizados antagonistas que son capaces de unirse a CD40 humano y están sustancialmente libres de actividad agonista.

La presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD40 que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 41, y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 40.

También se proporcionan:

- una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-CD40 de la invención, y un portador farmacéuticamente aceptable;
- un ácido nucleico aislado que codifica la SEQ ID NO: 41 y la SEQ ID NO: 40;
- un vector que comprende un ácido nucleico aislado de la invención;
- una célula huésped que comprende un vector de la invención, opcionalmente en donde la célula huésped es una célula procariota o una célula eucariota, y además opcionalmente en donde la célula huésped es una célula CHO o una célula COS; y
- un método para producir el anticuerpo anti-CD40 de la invención, el método que comprende las etapas de cultivar una célula huésped de la invención en medio de cultivo en condiciones suficientes para producir el anticuerpo anti-CD40.

El anticuerpo de la invención comprende una región variable de la cadena pesada que comprende un conjunto de CDR de las SEQ ID NO: 6, 42 y 8, y una región variable de la cadena ligera que comprende un conjunto de CDR de las SEQ ID NO: 21, 11 y 12.

El anticuerpo antagonista anti-CD40 de la invención está humanizado. En la presente descripción se describen anticuerpos antagonistas anti-CD40, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un marco aceptor humano, opcionalmente en donde el marco aceptor humano comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 82-106. También se describen anticuerpos antagonistas anti-CD40, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un marco aceptor humano, en donde el marco comprende al menos una sustitución de aminoácidos de la región marco, y en donde la secuencia de aminoácidos del marco es al menos 65 % idéntica a la secuencia de dicho marco aceptor humano y comprende al menos 70 residuos de aminoácidos idénticos a dicho marco aceptor humano. También se describe en la presente descripción, el marco aceptor humano comprende al menos una sustitución de aminoácidos de la región marco en un residuo clave, dicho residuo clave seleccionado de:

- un residuo adyacente a una CDR;
- un residuo del sitio de glicosilación;
- un residuo raro;

un residuo capaz de interactuar con CD40 humano;
 un residuo capaz de interactuar con una CDR;
 un residuo canónico;
 un residuo de contacto entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera;
 un residuo dentro de una zona Vernier; y
 un residuo en una región que se superpone entre una CDR1 de la cadena pesada variable definida por Chothia y un primer marco de la cadena pesada definido por Kabat.

En un aspecto de la descripción, el residuo clave se selecciona de 48H, 49H y 36L. En otro aspecto de la descripción, la sustitución del residuo clave está en la región de la cadena pesada variable y es V48I o S49A. En otro aspecto, la sustitución del residuo clave está en la región de la cadena ligera variable y es Y36F.

El anticuerpo antagonista anti-CD40 de la invención comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 28 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 20.

En una modalidad, el anticuerpo antagonista anti-CD40 está sustancialmente libre de actividad agonista. En otra modalidad, el anticuerpo antagonista anti-CD40 inhibe la unión de CD40 al ligando de CD40 (CD40L) o al ligando de CD40 soluble (sCD40L). En otra modalidad adicional, el anticuerpo antagonista anti-CD40 se une a CD40 cyno. En una modalidad, el anticuerpo anti-CD40 se une a CD40 humano y cyno, pero no se une a CD40 de rata, conejo o ratón.

En otra modalidad, el anticuerpo antagonista anti-CD40 es capaz de modular una función biológica de CD40. En una modalidad adicional, el anticuerpo antagonista anti-CD40 es capaz de neutralizar a CD40. En otra modalidad adicional más, el anticuerpo antagonista anti-CD40 inhibe la activación de NF- κ B.

En una modalidad, el anticuerpo antagonista anti-CD40 tiene una constante de velocidad de activación (K_{on}) a CD40 seleccionada de al menos aproximadamente $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; al menos aproximadamente $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; y al menos aproximadamente $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; medido por resonancia de plasmones de superficie.

En otra modalidad, el anticuerpo antagonista anti-CD40 tiene una constante de disociación (K_D) a CD40 seleccionada del grupo que consiste en: como máximo aproximadamente 10^{-7} M ; como máximo aproximadamente 10^{-8} M ; como máximo aproximadamente 10^{-9} M ; como máximo aproximadamente 10^{-10} M ; como máximo aproximadamente 10^{-11} M ; como máximo aproximadamente 10^{-12} M ; y como máximo 10^{-13} M .

También se describe en la presente descripción un anticuerpo antagonista anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 28, y/o un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 20.

También se describe en la presente descripción un anticuerpo antagonista anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 41, o una secuencia que tiene al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 41, y/o una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 40, o una secuencia que tiene al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 40. En un aspecto de la descripción, la cadena pesada del anticuerpo antagonista anti-CD40, o la porción de unión a antígeno del mismo, comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 41, y la cadena ligera del anticuerpo antagonista anti-CD40, o la porción de unión a antígeno del mismo, comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 40.

En una modalidad, los anticuerpos de la invención son recombinantes.

La presente invención también caracteriza, en ciertas modalidades, una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-CD40 como se establece en cualquiera de las modalidades descritas en la presente descripción, y un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también caracteriza, en otras ciertas modalidades, una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-CD40 como se establece en cualquiera de las modalidades descritas en la presente descripción, y un polisorbato. En una modalidad relacionada adicional, el polisorbato es polisorbato 80.

En otra modalidad, la composición farmacéutica comprende un tampón de histidina.

En otra modalidad adicional, la composición farmacéutica comprende un poliol. En una modalidad relacionada, el poliol se selecciona de manitol, sorbitol, trehalosa o sacarosa.

En otra modalidad, la composición farmacéutica tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 8. En una modalidad relacionada, la composición farmacéutica tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 7.

En otra modalidad, la composición farmacéutica se liofiliza.

La presente invención también presenta, en otras modalidades, un ácido nucleico aislado que codifica una secuencia de aminoácidos del anticuerpo antagonista anti-CD40 de cualquiera de los aspectos y modalidades descritos en la presente descripción. En una modalidad adicional, la presente invención presenta un vector que comprende el ácido nucleico aislado. En una modalidad relacionada, el vector se selecciona de los vectores pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV y pBJ.

En otra modalidad, una célula huésped comprende el vector. En una modalidad relacionada, la célula huésped es una célula procariota o una célula eucariota. En una modalidad adicional, la célula eucariota es una célula protista, una célula animal, una célula vegetal, una célula fúngica, una célula de levadura, una célula de mamífero, una célula aviar o una célula de insecto. En otra modalidad adicional, la célula de mamífero es una célula CHO o una célula COS.

La presente invención también presenta, en ciertas modalidades, un método para producir un anticuerpo antagonista anti-CD40, el método que comprende las etapas de cultivar una célula huésped de cualquiera de las modalidades descritas en la presente descripción en medio de cultivo en condiciones suficientes para producir el anticuerpo antagonista anti-CD40. En modalidades adicionales, se produce un anticuerpo antagonista anti-CD40 mediante el método.

La presente descripción también presenta, en otros ciertos aspectos, un método para determinar la presencia de CD40 o un fragmento del mismo en una muestra de prueba mediante un inmunoensayo, en donde el inmunoensayo comprende poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, de cualquiera de los aspectos y modalidades descritos en la presente descripción, y al menos un marcador detectable. En otro aspecto, el método comprende además las etapas de: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, se une a un epítipo en CD40 o fragmento del mismo para formar un primer complejo; (ii) poner en contacto el complejo con al menos un marcador detectable, en donde el marcador detectable se une a un epítipo en el primer complejo, o en el CD40 o fragmento del mismo, que no está unido por el anticuerpo, o la porción de unión a antígeno del mismo, para formar un segundo complejo; y (iii) detectar la presencia del CD40 o fragmento del mismo en la muestra de prueba en base a la señal generada por el marcador detectable en el segundo complejo, en donde la presencia del CD40 o fragmento del mismo se correlaciona directamente con la señal generada por el marcador detectable. En un aspecto relacionado adicional, el método comprende además las etapas de: (i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, se une a un epítipo en el CD40 o fragmento del mismo para formar un primer complejo; (ii) poner en contacto el complejo con al menos un marcador detectable, en donde el marcador detectable compite con el CD40 o fragmento del mismo para unirse al anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, para formar un segundo complejo; y (iii) detectar la presencia del CD40 o fragmento del mismo en la muestra de prueba en base a la señal generada por el marcador detectable en el segundo complejo, en donde la presencia del CD40 o fragmento del mismo se correlaciona indirectamente con la señal generada por el marcador detectable.

En un aspecto, la descripción proporciona un DVD-Ig que comprende las regiones de unión, *por ejemplo*, CDR, descritas en la presente descripción. En un aspecto, el DVD-Ig de la invención comprende cuatro cadenas de polipéptidos, en donde dos cadenas de polipéptidos comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de la cadena pesada, VD2 es un segundo dominio variable de la cadena pesada, C es un dominio constante de la cadena pesada, X1 es un enlazador con la condición de que no sea CH1, y X2 es una región Fc; y dos cadenas de polipéptidos comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de la cadena ligera, VD2 es un segundo dominio variable de la cadena ligera, C es un dominio constante de la cadena ligera, X1 es un enlazador con la condición de que no sea CH1, y X2 no comprenda una región Fc; y n es 0 o 1; en donde dichas cuatro cadenas de polipéptidos de dicha proteína de unión forman cuatro sitios funcionales de unión a antígeno. En un aspecto, la primera (y/o segunda) cadena pesada del DVD comprende un conjunto de CDR como se establece en las SEQ ID NOs: 6, 42 y 8. En un aspecto, la primera (y/o segunda) región variable de la cadena ligera comprende un conjunto de CDR como se establece en las SEQ ID NO: 21, 11 y 12. En un aspecto, el DVD-Ig de la invención es monoespecífico y se une a huCD40. En otro aspecto, el DVD-Ig de la invención es multiespecífico y se une a CD40 y una segunda diana molecular.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A representa gráficamente la actividad antagonista del anticuerpo quimérico (Anticuerpo 1 (Ab1)) frente a un control agonista y anticuerpos antagonistas conocidos (4D11 (Astellas) y Bib (Boehringer)). **La Figura 1B** representa gráficamente la actividad del mismo anticuerpo quimérico Ab1 en un ensayo de agonista mediante el uso de los mismos controles de agonista y antagonista que la Figura 1A.

La Figura 2 representa gráficamente la actividad agonista (Figura 2A) y la actividad antagonista (Figura 2B) del anticuerpo humanizado Ab101 en comparación con el anticuerpo 4D11, el anticuerpo B1b, un anticuerpo IgG (control) y un anticuerpo agonista de control (2141).

La Figura 3 representa gráficamente los resultados de estudios *in vivo* del anticuerpo humanizado Ab101. La Figura 3A representa gráficamente la producción de IgG en ratones *huscid* que han recibido PBMC humanos en combinación con un control de Ig, una fusión CTLA4-Ig o el anticuerpo Ab101. La Figura 3B representa gráficamente la supervivencia de las células B en el mismo modelo de ratón al que se le administraron los mismos agentes que la Figura 3A.

La Figura 4 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de los antagonistas de anticuerpos murinos CD40 antihumanos, y las secuencias consenso de alineación. **La Figura 4A** muestra un alineamiento de secuencia de las cadenas ligeras variables del Anticuerpo 3 (Ab3) (SEQ ID NO: 48), Ab1 (SEQ ID NO: 9) y Anticuerpo 2 (Ab2) (SEQ ID NO: 76) y la Secuencia consenso de la cadena ligera variable (SEQ ID NO: 116). **La Figura 4B** muestra un alineamiento de secuencia de las cadenas pesadas variables de Ab3 (SEQ ID NO: 44), Ab1 (SEQ ID NO: 5) y Ab2 (SEQ ID NO: 75) y la Secuencia consenso de la cadena pesada variable (SEQ ID NO: 117).

Las Figuras 5A y 5B representan gráficamente la potencia de neutralización representativa (actividad antagonista) (Figura 5A) y la actividad agonista (Figura 5B) de Ab102 en CD40 humano en los ensayos de activación de monocitos descritos en el Ejemplo 7. La activación de monocitos corresponde con aumentos en la concentración de TNF dentro de cada ensayo.

La Figura 6 representa gráficamente la inhibición sensible a la dosis de la puntuación de endoscopia con la administración profiláctica del anticuerpo 138 (Ab138). El anticuerpo 138 se probó a dosis de 15, 5, 1,5 y 0,5 mg/kg. Se usó un control negativo de IgG. El tratamiento anti p40IL-12/23 se usó como un control positivo. La enfermedad está mediada por células CD45Rbhi que se transfieren a los animales. RBlow se refiere al grupo de control negativo. Las células CD45RBlow no median la enfermedad.

La Figura 7 representa gráficamente los resultados del análisis inmunohistoquímico para determinar los macrófagos IBA1+ en el colon con la administración del anticuerpo 138 (Ab138). El análisis histológico de las secciones del colon mostró una disminución en los macrófagos (medida general de inflamación). Se usó un control negativo de IgG. El tratamiento anti p40IL-12/23 se usó como un control positivo.

La Figura 8 representa gráficamente los niveles séricos del anticuerpo circulante 138 (Ab138) 96 horas (igual a C_{min}) después de la dosis final en el modelo de colitis por transferencia de células T. Se demostró que los niveles séricos eran sensibles a la dosis. El tratamiento anti p40IL-12/23 se usó como un control positivo. Solo 1 animal en el grupo de 0,5 mg/kg tiene niveles medibles de Ab138. **La Figura 9A** representa gráficamente los resultados de la endoscopia después de la administración del anticuerpo 138 en un modelo de colitis de ratón. El tratamiento con el anticuerpo 138 (Ab138) se inició tres semanas después de la inyección celular, después de la confirmación de la enfermedad por endoscopia, y se observó una inhibición sensible a la dosis del puntaje de suma MEDAI. La dosis más alta (15 mg/kg) alcanzó significación estadística (Figura 9A).

La Figura 9B representa gráficamente los resultados histológicos después de la administración del anticuerpo 138. El análisis histológico de los macrófagos IBA1+ en el colon como una medida de inflamación mieloide se muestra en la Figura 9B.

La Figura 10 representa gráficamente los resultados que muestran que Ab102 suprimió la IgM anti KLH y la IgG anti KLH (línea discontinua) en comparación con los animales de control tratados solo con vehículo (líneas continuas). A los monos *Cynomolgus* (dos/sexo/grupo) se les administró Ab102 a dosis de 0 (solo vehículo) o 10 mg/kg por vía subcutánea (SC) durante 5 semanas. La hemocianina de lapa californiana (KLH) se administró a todos los animales el día 8. Se recogieron muestras de suero de cada animal a -11, -7, 0, 4, 7, 10, 14 y 21 días en relación con la administración de KLH (días de KLH).

La Figura 11A es un gráfico que muestra que el tratamiento con el anticuerpo 138 anti-CD40 previno la proteinuria en ratones MRL/lpr. Los ratones se dosificaron con 15 mg/kg de anticuerpo 2x/semana, 5 mg/kg de anticuerpo 2x/semana, 1,5 mg/kg de anticuerpo 2x/semana o 15 mg/kg de anticuerpo 1x/semana. La administración del vehículo de solución salina tamponada con fosfato (PBS) solo se usó como un control. La proteinuria se determinó como el por ciento de proteína en orina < 300 mg/dL.

La Figura 11B es un gráfico que representa los resultados que muestran que el tratamiento con el anticuerpo 138 anti-CD40 prolonga la supervivencia de los ratones MRL/lpr. Los animales se dosificaron con 15 mg/kg de anticuerpo 2x/semana, 5 mg/kg de anticuerpo 2x/semana, 1,5 mg/kg de anticuerpo 2x/semana o 15 mg/kg de anticuerpo 1x/semana. La administración del vehículo solo se usó como un control. El por ciento de supervivencia se indicó con el tiempo.

La Figura 12A es un gráfico que representa los resultados que muestran que el tratamiento con el anticuerpo 138 anti-CD40 previno el desarrollo de nefritis. La Figura 12A muestra el efecto del anticuerpo 138 sobre la enfermedad glomerular en ratones dosificados con 15 mg/kg de anticuerpo 2x/semana, 5 mg/kg de anticuerpo 2x/semana, 1,5 mg/kg de anticuerpo 2x/semana o 15 mg/kg de anticuerpo 1x/semana, en el día 29 y día 63. La administración del vehículo de PBS solo se usó como un control. La enfermedad glomerular se evaluó en una escala de 0-4. A medida que la gravedad de la enfermedad glomerular empeoró en ratones MRL envejecidos, el anticuerpo 138 mantuvo la eficacia para minimizar la enfermedad glomerular a 5 y 15 mg/kg. La inflamación perivascular se calificó en una escala de 0-4 según los siguientes

criterios: 0 - hasta unos pocos linfocitos raros; 1 - unos pocos linfocitos que forman agregados sueltos; 2 - linfocitos que forman pequeños agregados discretos; 3 - agregado polarizado de linfocitos que se abultan en la luz de la vena adyacente pero no logran rodear completamente la arteria arqueada; 4 - agregado de linfocitos que rodea completamente y se extiende hacia la adventicia de la arteria arqueada.

La Figura 12B es un gráfico que representa los resultados que muestran que el tratamiento con anticuerpo anti-CD40 previno el desarrollo de nefritis. La Figura 12B representa los resultados que muestran el efecto del anticuerpo 138 sobre la inflamación perivascular (PV) del riñón en ratones dosificados con 15 mg/kg de anticuerpo 2x/semana, 5 mg/kg de anticuerpo 2x/semana, 1,5 mg/kg de anticuerpo 2x/semana o 15 mg/kg de anticuerpo 1x/semana, en el día 29 y día 63. La administración del vehículo de PBS solo se usó como un control. El anticuerpo anti-CD40 a 5 y 15 mg/kg fue eficaz para reducir los infiltrados perivascuales (PV) en el riñón a los 29 y 63 días.

La Figura 12C es un gráfico que muestra que el tratamiento con el anticuerpo 138 anti-CD40 previno el desarrollo de nefritis. La Figura 12C muestra el efecto del anticuerpo 138 sobre la inflamación tubulointersticial (TI) en ratones dosificados con 15 mg/kg de anticuerpo 2x/semana, 5 mg/kg de anticuerpo 2x/semana, 1,5 mg/kg de anticuerpo 2x/semana o 15 mg/kg de anticuerpo 1x/semana, en el día 29 y día 60. La administración del vehículo de PBS solo se usó como un control. TI se redujo temprano en la enfermedad.

La Figura 13A es un gráfico que muestra que el tratamiento con el anticuerpo 138 anti-CD40 previno la inflamación de la glándula salival. La Figura 13A muestra el efecto del anticuerpo 138 sobre la inflamación de la glándula salival en ratones dosificados con 15 mg/kg de anticuerpo 2x/semana, 5 mg/kg de anticuerpo 2x/semana, 1,5 mg/kg de anticuerpo 2x/semana o 15 mg/kg de anticuerpo 1x/semana, en el día 29 y día 60. La administración del vehículo de PBS solo se usó como un control. La inflamación periductular se calificó en una escala de 0 a 4 según los siguientes criterios: 0 - hasta unos pocos leucocitos raros; 1 - unos pocos leucocitos que forman agregados sueltos; 2 - leucocitos que forman pequeños agregados discretos; 3 - agregado polarizado de leucocitos que rodean completamente el conducto; 4 - agregado de leucocitos que se extiende hacia el parénquima glandular de la glándula salival.

La Figura 13B es un gráfico que muestra que el tratamiento con el anticuerpo 138 anti-CD40 previno la inflamación de las articulaciones. La Figura 13B muestra el efecto del anticuerpo 138 sobre la inflamación articular en ratones dosificados con 15 mg/kg de anticuerpo 2x/semana, 5 mg/kg de anticuerpo 2x/semana, 1,5 mg/kg de anticuerpo 2x/semana o 15 mg/kg de anticuerpo 1x/semana, en el día 29 y día 60. La administración del vehículo de PBS solo se usó como un control. Se calificó la inflamación articular para cada una de las dos patas por ratón en una escala de 0-4 según los siguientes criterios: 0: sin inflamación; 1 - unos pocos leucocitos en el espacio articular; 2 - leucocitos frecuentes dentro del espacio articular con proliferación sinovial leve; 3 - leucocitos que expanden espacios articulares con proliferación sinovial moderada; 4 - proliferación de leucocitos y sinoviales que se extiende y se une dentro de todos los espacios articulares con marcada erosión y/o proliferación ósea. Los puntajes se añadieron para un puntaje total posible de 8 por ratón.

La Figura 14 es un panel de cuatro gráficos (i-iv) que muestra que el anticuerpo 138 anti-CD40 previno la expansión de las células T auxiliares foliculares (Tfh) y las células B del centro germinal (GC) en el bazo, según lo determinado por citometría de flujo. Los ratones se dosificaron con 15 mg/kg de anticuerpo 2x/semana, 5 mg/kg de anticuerpo 2x/semana, 1,5 mg/kg de anticuerpo 2x/semana o 15 mg/kg de anticuerpo 1x/semana. La administración del vehículo de PBS solo se usó como un control. El panel (i) muestra el número de células Tfh en el bazo en el día 29. El panel (ii) muestra el número de células Tfh en el bazo en el día 63. El panel (iii) muestra el número de células B del GC en el bazo en el día 29. El panel (iv) muestra el número de células B del GC en el bazo en el día 63. **La Figura 15A** es un gráfico que muestra que el tratamiento con el anticuerpo 138 anti-CD40 previno un aumento en los niveles de IgG circulantes totales en el día 29. Los ratones se dosificaron con 15 mg/kg de anticuerpo 2x/semana, 5 mg/kg de anticuerpo 2x/semana, 1,5 mg/kg de anticuerpo 2x/semana y 15 mg/kg de anticuerpo 1x/semana. La administración del vehículo de PBS solo se usó como un control.

La Figura 15B es un gráfico que muestra que el tratamiento con el anticuerpo 138 anti-CD40 previno un aumento en los niveles de IgG circulantes totales en el día 63. Los ratones se dosificaron con 15 mg/kg de anticuerpo 2x/semana, 5 mg/kg de anticuerpo 2x/semana, 1,5 mg/kg de anticuerpo 2x/semana y 15 mg/kg de anticuerpo 1x/semana. La administración del vehículo de PBS solo se usó como un control.

La Figura 16A es un gráfico que muestra el efecto del tratamiento con el anticuerpo 138 anti-CD40 sobre los títulos de anti-ADN bicatenario (anti-dsADN) en el día 29. Los ratones se dosificaron con 15 mg/kg de anticuerpo 2x/semana, 5 mg/kg de anticuerpo 2x/semana, 1,5 mg/kg de anticuerpo 2x/semana o 15 mg/kg de anticuerpo 1x/semana. La administración del vehículo de PBS solo se usó como un control. En el día 29, se determinaron los títulos de anti-dsADN.

La Figura 16B es un gráfico que muestra el tratamiento del anticuerpo 138 anti-CD40 sobre los títulos de anti-ADN bicatenario (anti-dsADN) en el día 63. Los ratones se dosificaron con 15 mg/kg de anticuerpo 2x/semana, 5 mg/kg de anticuerpo 2x/semana, 1,5 mg/kg de anticuerpo 2x/semana o 15 mg/kg de anticuerpo 1x/semana. La administración del vehículo de PBS solo se usó como un control. En el día 63, se determinaron los títulos de anti-dsADN.

La Figura 17A es un gráfico que muestra la dosificación profiláctica del anticuerpo 138 anti-CD40 que previno la proteinuria. El tratamiento profiláctico se inició en ratones a las 26 semanas de edad, y los ratones proteinúricos se excluyeron del estudio. Los ratones se dosificaron con 15 mg/kg de anticuerpo 2x/semana, 1,5 mg/kg de anticuerpo

2x/semana o 15 mg/kg de anticuerpo 1x/semana. La administración del vehículo de PBS solo se usó como un control. La proteinuria se determinó como el por ciento de proteína en orina < 300 mg/dL. **La Figura 17B** es un gráfico que muestra que la dosificación profiláctica del anticuerpo 138 anti-CD40 extiende la supervivencia mediante el uso de un modelo de ratón SLE. El tratamiento profiláctico se inició en ratones a las 26 semanas de edad, y los ratones proteinúricos se excluyeron del estudio. Los ratones se dosificaron con 15 mg/kg de anticuerpo 2x/semana, 1,5 mg/kg de anticuerpo 2x/semana o 15 mg/kg de anticuerpo 1x/semana. La administración del vehículo de PBS solo se usó como un control. El por ciento de supervivencia se evaluó hasta las 36 semanas de edad.

La Figura 18A es un gráfico que muestra que los ratones tratados con el anticuerpo 138 a una dosis de 15 mg/kg IP 2x/semana, desarrollaron baja proteinuria con el tiempo, como lo muestra el grado de proteína en orina (equivalente mg/dL). El vehículo de PBS administrado IP, 2x/semana se usó como un control. La prednisolona se administró a una dosis de 10 mg/kg por vía oral (PO), una vez al día (SID). Ni los ratones control no tratados vehículo de PBS ni los ratones tratados con prednisolona desarrollaron baja proteinuria. El umbral de proteinuria se indica como 300 mg/dL.

La Figura 18B es un gráfico que muestra la velocidad de recuperación de la proteinuria en ratones tratados con el anticuerpo 138 a una dosis de 15 mg/kg IP 2x/semana. Según la velocidad de recuperación de la proteinuria determinada por el por ciento de proteína en orina normal, el tiempo promedio de recuperación de la proteinuria fue de 23 ± 7 días. El vehículo de PBS administrado IP, 2x/semana se usó como un control. La prednisolona se administró a una dosis de 10 mg/kg por vía oral (PO), una vez al día (SID).

La Figura 18C es un gráfico que muestra que los ratones tratados con el anticuerpo 138 anti-CD40 a una dosis de 15 mg/kg IP 2x/semana, prolongaron significativamente la supervivencia, como se muestra por el por ciento de supervivencia. El vehículo de PBS administrado IP, 2x/semana se usó como un control. La prednisolona se administró por vía oral (PO), una vez al día (SID).

La Figura 19A es un gráfico que muestra que la producción de saliva se conserva mediante el tratamiento profiláctico con el anticuerpo 138 a una dosis de 15 mg/kg IP 2x/semana, 1,5 mg/kg 2x/semana, 15 mg/kg 1x/semana. El vehículo de PBS se usó como un control. La prednisolona se administró a una dosis de 10 mg/kg. Como una comparación adicional, se usó la producción de saliva de ratones NZBWF-1 de 7 semanas de edad, que son ratones más jóvenes no enfermos. Se determinó la cantidad de saliva (mg). La producción de saliva por los ratones tratados con anti-CD40 fue comparativamente uniforme.

La Figura 19B es un gráfico que muestra que el volumen de saliva se conserva mediante el tratamiento profiláctico con anticuerpo 138 anti-CD40 a una dosis de 15 mg/kg IP 2x/semana, 1,5 mg/kg 2x/semana, 15 mg/kg 1x/semana. El vehículo de PBS se usó como un control. La prednisolona se administró a una dosis de 10 mg/kg. Se determinó el volumen de saliva/peso corporal (mg/g). La producción de saliva por ratones tratados con anticuerpos anti-CD40 fue significativamente mayor que en ratones de control no tratados.

La Figura 20A es un gráfico que muestra que la producción de saliva se conservó mediante el tratamiento terapéutico con anticuerpo 138 anti-CD40 a una dosis de 15 mg/kg. La prednisolona se administró a una dosis de 10 mg/kg. La producción de saliva en ratones de 11 semanas de edad se usó como una comparación adicional. Se determinó la cantidad de saliva (mg).

La Figura 20B es un gráfico que muestra que la producción de saliva se conserva mediante el tratamiento terapéutico con el anticuerpo 138 anti-CD40 a una dosis de 15 mg/kg. La prednisolona se administró a una dosis de 10 mg/kg. La producción de saliva en ratones de 11 semanas de edad se usó como una comparación adicional. Se determinó el volumen de saliva/peso corporal (mg/g).

Descripción detallada de la invención

Esta invención se refiere a anticuerpos antagonistas anti-CD40 y usos de los mismos. Diversos aspectos de la invención se refieren a anticuerpos y composiciones farmacéuticas de los mismos, así como a ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes y células huésped para producir tales anticuerpos. Los métodos para usar los anticuerpos de la invención para detectar CD40 humano, para inhibir la actividad de CD40/CD40L humano, *in vitro* o *in vivo*, se describen en la presente descripción. También se describen anticuerpos anti-CD40 para su uso en un método de prevención o tratamiento de enfermedades o trastornos en los que CD40 es perjudicial en un sujeto humano, tal como la enfermedad inflamatoria crónica y la enfermedad de Crohn.

A menos que se defina lo contrario en la presente descripción, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tendrán los significados que comúnmente entienden los expertos en la técnica. El significado y el alcance de los términos deben ser claros, sin embargo, en caso de ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en la presente descripción tienen prioridad sobre cualquier diccionario o definición extrínseca. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán las pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "que incluye", así como otras formas, como "incluye" e "incluido", no es limitante. Además, términos como "elemento" o "componente"

abarcan tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario.

En general, las nomenclaturas usadas en relación con, y las técnicas de cultivo de células y tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química e hibridación de proteínas y ácidos nucleicos descritas en la presente descripción son las bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Los métodos y técnicas de la presente invención se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente descripción a menos que se indique lo contrario. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se realiza comúnmente en la técnica o como se describe en la presente descripción. Las nomenclaturas usadas en relación con los procedimientos y técnicas de laboratorio de química analítica, química orgánica sintética y química farmacéutica y medicinal descritas en la presente descripción son las bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Las técnicas estándar se usan para síntesis química, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y suministro, y tratamiento de pacientes.

Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, los términos seleccionados se definen a continuación.

El término "polipéptido" como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. Los términos "péptido" y "proteína" se usan indistintamente con el término polipéptido y también se refieren a una cadena polimérica de aminoácidos. El término "polipéptido" abarca proteínas nativas o artificiales, fragmentos de proteínas y análogos de polipéptidos de una secuencia de proteína. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

El término "proteína aislada" o "polipéptido aislado" es una proteína o polipéptido que en virtud de su origen o fuente de derivación no está asociado con componentes asociados naturalmente que lo acompañan en su estado nativo; está sustancialmente libre de otras proteínas de la misma especie; se expresa por una célula de una especie diferente; o no está presente en la naturaleza. Por lo tanto, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula de la que se origina naturalmente será "aislado" de sus componentes asociados naturalmente. Una proteína también puede volverse sustancialmente libre de componentes asociados naturalmente mediante aislamiento, al usar técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en la técnica. Un ejemplo de un polipéptido aislado es un anticuerpo aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo.

El término "recuperación", como se usa en la presente descripción, se refiere al proceso de hacer que una especie química tal como un polipéptido esté sustancialmente libre de componentes asociados naturalmente mediante aislamiento, *por ejemplo*, al usar técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en la técnica.

Los términos "CD40 humano" y "CD40 humano de tipo salvaje" (abreviado en la presente descripción como hCD40, hCD40wt), como se usa en la presente descripción, se refiere a una proteína transmembrana de tipo I. En una modalidad, el término CD40 humano pretende incluir CD40 humano recombinante (rhCD40), que puede prepararse mediante métodos estándar de expresión recombinante. La Tabla 1 proporciona la secuencia de aminoácidos de CD40 humano (es decir, SEQ ID NO. 1), y el dominio extracelular del mismo (es decir, SEQ ID NO: 107), que se conocen en la técnica.

TABLA 1: Secuencia de CD40 humano

Identificador de secuencia	Proteína	Secuencia
SEQ ID NO: 1	CD40 humano	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCC SLCQPGQKLVS DCTEFTE TECLPCGESEFLDTWNRETH CHQH KYCDPNLGLRVQQGTSETDTICTCEEGWHCTSE ACESC VLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFS NVSSAFEKCHPWTSCTKDLVVQQAGTNKTDVVC GPQD RLRALVVIPIIFGILFAILLVLVFIKKVAKKPTNKAPH PKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDG KESRISVQERQ
SEQ ID NO:107	Dominio extracelular de CD40 humano	EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVS DCTEFTE TECLPCGESEFLDTWNRETHCHQH KYCDPNLGLRVQ QGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESC V

"Actividad biológica", como se usa en la presente descripción, se refiere a todas las propiedades biológicas inherentes del receptor CD40. Las propiedades biológicas de CD40 incluyen, pero no se limitan a, la unión de CD40L; la participación en el desarrollo de las células B; la participación en la activación de los linfocitos; la participación en la función de las células presentadoras de antígeno; regular la actividad de las células dendríticas, macrófagos y células B; inducir la producción de citocinas inflamatorias en macrófagos y células dendríticas; regular de manera positiva la presentación antigénica; regular a la alza la estimulación de las células T; y promover el cambio de clase de inmunoglobulina en las células B.

Los términos "unión específica" o "unión específicamente", como se usa en la presente descripción, en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, significa que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (*por ejemplo*, un determinante antigénico o epítipo) en la especie química; *por ejemplo*, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura de proteína específica en lugar de a proteínas en general. Si un anticuerpo es específico para el epítipo "A", la presencia de una molécula que contiene el epítipo A (o A libre, no marcado), en una reacción que contiene "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

El término "agonista", como se usa en la presente descripción, se refiere a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés, *por ejemplo*, CD40, provoca un aumento en la magnitud de una determinada actividad o función de la molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del agonista.

El término "antagonista" o "inhibidor", como se usa en la presente descripción, se refiere a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés, provoca una disminución en la magnitud de una determinada actividad o función de la molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del antagonista. Los antagonistas particulares de interés incluyen aquellos que bloquean o modulan la actividad biológica o inmunológica del CD40 humano (hCD40). Un anticuerpo antagonista de hCD40 puede, *por ejemplo*, inhibir la regulación positiva de CD86 de las células B humanas primarias que se cultivan con (o se exponen a) CD40L (tal como cultivar las células B con células T humanas que expresan CD40L). En un aspecto de la descripción, un anticuerpo antagonista anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, que está sustancialmente libre de actividad agonista se define como que tiene un nivel de actividad que es equivalente o está dentro de una desviación estándar de un control negativo en un ensayo de agonista, tal como el ensayo de monocitos agonistas descrito en el Ejemplo 7.

El anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo antagonista que provoca una disminución en la actividad o función de CD40 en comparación con la actividad o función de CD40 en ausencia del anticuerpo. En modalidades particulares, el anticuerpo está sustancialmente libre de actividad agonista, *es decir*, el anticuerpo no provoca un aumento en la magnitud de la actividad o función de CD40 en comparación con la actividad o función de CD40 en ausencia del anticuerpo. La actividad agonista y antagonista también se puede evaluar mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, *por ejemplo*, al usar una línea celular reportera que expresa CD40 que expresa CD40 humano unido a fosfatasa alcalina (AP) mediado por NFkB o un ensayo de células B. Además, la actividad agonista y antagonista puede evaluarse mediante el uso de los ensayos *in vitro* de agonista y antagonista de monocitos descritos en el Ejemplo 7.

El término "inhibir la unión a CD40L" se refiere a la capacidad del anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, para prevenir la unión de CD40 al ligando, CD40L. Tal inhibición de la unión a CD40L daría como resultado una disminución o supresión de la actividad biológica mediada por la unión de CD40 a CD40L.

El término "anticuerpo", como se usa en la presente descripción, se refiere en general a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) compuesta por cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), o cualquier fragmento funcional, mutante, variante o derivación del mismo, que conserva las características esenciales de unión al epítipo de una molécula de Ig. Tales formatos de anticuerpos mutantes, variantes o derivados se conocen en la técnica. Los ejemplos de los cuales se discuten a continuación.

En un anticuerpo de longitud completa, cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada aquí como HCVR o VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de la cadena ligera (abreviada aquí como LCVR o VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera se compone de un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con las regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el terminal amino al terminal carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (*por ejemplo*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (*por ejemplo*, IgG 1, IgG2, IgG 3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

El término "porción de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo" o "fragmento de anticuerpo"), como se usa en la presente descripción, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (*por ejemplo*, hCD40). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Tales fragmentos también pueden ser formatos biespecíficos, específicos duales o multiespecíficos;

específicamente se unen a dos o más antígenos diferentes. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward y otros, (1989) Nature 341: 544-546, Winter y otros, publicación PCT WO 90/05144 A1), que comprende un único dominio variable; y (vi) una región determinante de la complementariedad aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, mediante el uso de métodos recombinantes, por un enlazador sintético que les permite formarse como una cadena de proteína única en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); ver, *por ejemplo*, Bird y otros (1988) Science 242: 423-426; y Huston y otros (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Tales anticuerpos de cadena sencilla también están destinados a estar incluidos en el término "porción de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. También se incluyen otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, como los diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena de polipéptido, pero usan un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, lo que obliga a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y lo que crea así dos sitios de unión a antígeno (véase, *por ejemplo*, Holliger, P., y otros (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, RJ, y otros (1994) Structure 2: 1121-1123). Tales porciones de unión de anticuerpos son conocidas en la técnica (Kontermann y Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. Nueva York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

El término "constructo de anticuerpo", como se usa en la presente descripción, se refiere a un polipéptido que comprende una o más porciones de unión a antígeno de la invención unidas a un polipéptido enlazador o un dominio constante de inmunoglobulina. Los polipéptidos enlazadores comprenden dos o más residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y se usan para unir una o más porciones de unión a antígeno. Tales polipéptidos enlazadores son bien conocidos en la técnica (véase, *por ejemplo*, Holliger, P., y otros (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, RJ, y otros (1994) Structure 2: 1121-1123). Un dominio constante de inmunoglobulina se refiere a un dominio constante de la cadena pesada o ligera. Las secuencias de aminoácidos del dominio constante de la cadena pesada y cadena ligera de IgG humana se conocen en la técnica y se representan en la Tabla 2.

TABLA 2: Secuencia del dominio constante de la cadena pesada y el dominio constante de la cadena ligera de IgG humana

Proteína	Identificador de secuencia	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
Región constante de Ig gamma-1	SEQ ID NO: 2	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK

5	Mutante de la región constante de Ig gamma-1	SEQ ID NO: 3	
10			ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
20	Región constante de Ig Kappa	SEQ ID NO: 4	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
25	Región constante de Ig Lambda	SEQ ID NO: 81	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNK YAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS
30			

Aún más, un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, puede ser parte de moléculas de inmunoadhesión más grandes, formadas por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o porción de anticuerpo con una o más proteínas o péptidos adicionales. Los ejemplos de tales moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región central de estreptavidina para hacer una molécula scFv tetramérica (Kipriyanov, SM, y otros (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6: 93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistidina C-terminal para producir moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, SM, y otros (1994) Mol. Immunol. 31: 1047-1058). Las porciones de anticuerpos, tales como los fragmentos Fab y F(ab')₂, se pueden preparar a partir de anticuerpos completos mediante el uso de técnicas convencionales, tales como la digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Además, los anticuerpos, las porciones de anticuerpos y las moléculas de inmunoadhesión se pueden obtener mediante el uso de técnicas estándar de ADN recombinante, como se describe en la presente descripción.

Un "anticuerpo aislado", como se usa en la presente descripción, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a hCD40 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos a hCD40). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a hCD40 puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como las moléculas de CD40 de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de una especie y secuencias de la región constante de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de la cadena pesada y ligera murina unidas a regiones constantes humanas.

El término "anticuerpo injertado con CDR" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de la cadena pesada y ligera de una especie pero en las que las secuencias de una o más de las regiones CDR de VH y/o VL se reemplazan con secuencias CDR de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de la cadena pesada y ligera murinas en las que una o más de las CDR murinas (por ejemplo, CDR3) se han reemplazado con secuencias de CDR humanas.

Los términos "numeración de Kabat", "definiciones de Kabat" y "etiquetado de Kabat" se usan indistintamente en la presente descripción. Estos términos, que se reconocen en la técnica, se refieren a un sistema de numeración de residuos de aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos de aminoácidos en las regiones variables de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo (Kabat y otros (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-391 y Kabat, E.A., y otros (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Publicación NIH No. 91-3242). Para la región variable de la cadena pesada, la región hipervariable varía desde las posiciones de aminoácidos 31 a 35 para CDR1, las

posiciones de aminoácidos 50 a 65 para CDR2 y las posiciones de aminoácidos 95 a 102 para CDR3. Para la región variable de la cadena ligera, la región hipervariable varía desde las posiciones de aminoácidos 24 a 34 para CDR1, las posiciones de aminoácidos 50 a 56 para CDR2 y las posiciones de aminoácidos 89 a 97 para CDR3.

- 5 Como se usa en la presente descripción, los términos "aceptor" y "anticuerpo aceptor" se refieren al anticuerpo o secuencia de ácido nucleico que proporciona o codifica al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o 100 % de las secuencias de aminoácidos de una o más de las regiones marco. En algunas modalidades, el término "aceptor" se refiere al aminoácido del anticuerpo o la secuencia de ácido nucleico que proporciona o codifica la región o regiones constantes. El término "aceptor" también puede referirse a la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos del anticuerpo que proporciona o codifica una o más de las regiones marco y la región o regiones constantes. En un aspecto específico de la descripción, el término "aceptor" se refiere a una secuencia de aminoácidos o ácido nucleico de un anticuerpo humano que proporciona o codifica al menos el 80 %, preferentemente, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos 98 %, o 100 % de las secuencias de aminoácidos de una o más de las regiones marco. De acuerdo con este aspecto, un aceptor puede contener al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, o al menos 10 residuos de aminoácidos que no se encuentra(n) en una o más posiciones específicas de un anticuerpo humano. Una región marco aceptor y/o una región o regiones constantes aceptoras pueden derivarse u obtenerse, *por ejemplo*, de un gen de anticuerpo de la línea germinal, un gen de anticuerpo maduro, un anticuerpo funcional (por ejemplo, anticuerpos bien conocidos en la técnica, anticuerpos en desarrollo, o anticuerpos disponibles comercialmente).
- 10
- 20 Como se usa en la presente descripción, el término "CDR" se refiere a la región determinante de la complementariedad dentro de las secuencias variables de los anticuerpos. Hay tres CDR en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, que se designan CDR1, CDR2 y CDR3, para cada una de las regiones variables. El término "conjunto de CDR", como se usa en la presente descripción, se refiere a un grupo de tres CDR que se encuentran en una única región variable capaz de unirse al antígeno. Los límites exactos de estos CDR se han definido de manera diferente de acuerdo con los diferentes sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat y otros, Sequences of Proteins of Immunological Interest (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) no solo proporcionan un sistema de numeración de residuos inequívoco aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también proporcionan límites de residuos precisos que definen las tres CDR. Estas CDR pueden denominarse CDR de Kabat. Chothia y colaboradores (Chothia y otros, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987) y Chothia y otros, Nature 342: 877-883 (1989)) encontraron que ciertas subporciones dentro de las CDR de Kabat adoptan casi conformaciones del esqueleto peptídico idénticas, a pesar de tener una gran diversidad a nivel de secuencia de aminoácidos. Estas subporciones fueron designadas como L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3 donde la "L" y la "H" designan las regiones de la cadena ligera y las cadenas pesadas, respectivamente. Estas regiones pueden denominarse CDR de Chothia, que tienen límites que se superponen con las CDR de Kabat. Padlan ha descrito otros límites que definen las CDR que se superponen con las CDR de Kabat. (FASEB J. 9: 133-139 (1995)) y MacCallum (J Mol Biol 262 (5): 732-45 (1996)). Aún otras definiciones de límites de las CDR pueden no seguir estrictamente uno de los sistemas anteriores, sin embargo se superpondrán con las CDR de Kabat, aunque pueden acortarse o alargarse a la luz de la predicción o hallazgos experimentales que residuos particulares o grupos de residuos o incluso CDR enteras no afectan significativamente la unión al antígeno. Los métodos usados en la presente descripción pueden utilizar CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, aunque las modalidades preferidas usan CDR definidas por Kabat o Chothia.
- 25
- 30
- 35
- 40

Como se usa en la presente descripción, el término residuo "canónico" se refiere a un residuo en una CDR o marco que define una estructura de CDR canónica particular como se define por Chothia y otros (J. Mol. Biol. 196: 901-907 (1987); Chothia y otros, J. Mol. Biol. 227: 799 (1992)). Según Chothia y otros, las porciones críticas de las CDR de muchos anticuerpos tienen conformaciones del esqueleto peptídico casi idénticas a pesar de la gran diversidad en el nivel de la secuencia de aminoácidos. Cada estructura canónica específica principalmente un conjunto de ángulos de torsión del esqueleto peptídico para un segmento contiguo de residuos de aminoácidos que forman un bucle.

45

Como se usa en la presente descripción, los términos "donante" y "anticuerpo donante" se refieren a un anticuerpo que proporciona una o más CDR. En el contexto de un anticuerpo humanizado, el término "anticuerpo donante" se refiere a un anticuerpo no humano que proporciona una o más CDR.

50

Como se usa en la presente descripción, el término "marco" o "secuencia marco" se refiere a las secuencias restantes de una región variable menos las CDR. Debido a que la definición exacta de una secuencia de CDR puede determinarse por diferentes sistemas, el significado de una secuencia marco está sujeto a interpretaciones correspondientemente diferentes. Las seis CDR (CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la cadena ligera y CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la cadena pesada) también dividen las regiones marco en la cadena ligera y la cadena pesada en cuatro subregiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, en la que CDR1 se ubica entre FR1 y FR2, CDR2 entre FR2 y FR3, y CDR3 entre FR3 y FR4. Sin especificar las subregiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región marco, según lo referido por otros, representa las FR combinados dentro de la región variable de una única cadena de inmunoglobulina presente de manera natural. Como se usa en la presente descripción, una FR representa una de las cuatro subregiones, y las FR representan dos o más de las cuatro subregiones que constituyen una región marco.

55

60

Las secuencias aceptoras de la cadena pesada y la cadena ligera humanas son conocidas en la técnica. Las secuencias aceptoras de la cadena pesada y la cadena ligera humanas de la descripción se seleccionan de las secuencias descritas en la Tabla 3 y la Tabla 4.

65

TABLA 3: Secuencias de aceptoras de la cadena pesada

SEQ ID No.	Región de la proteína	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
82	VH1-18&JH6 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFT
83	VH1-18&JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
84	VH1-18&JH6 FR3	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
85	VH1-18&JH6 FR4	WGQGTTTVTVSS
82	21/28&JH4 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFT
86	21/28&JH4 FR2	WVRQAPGQRLLEWMG
87	21/28&JH4 FR3	RVTITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR
88	21/28&JH4 FR4	WGQGTLLTVTVSS
89	VH2-26&JH6 FR1	QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSL
90	VH2-26&JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLAH
91 91	VH2-26&JH6 FR3	RLTISKDTSKSQVLTMTNMDPVDATYYCAR
85	VH2-26&JH6 FR4	WGQGTTTVTVSS
92	M60&JH4 FR1	QVTLRESGPALVKPTQTLTCTLYGFSL
93	M60&JH4 FR2	WIRQPPGKALEWLA
94	M60&JH4 FR3	RLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYYCAR
88	M60&JH4 FR4	WGQGTLLTVTVSS
82	VH1-46&JH6 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFT
83	VH1-46&JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
95	VH1-46&JH6 FR3	RVTMTTDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAR
85	VH1-46&JH6 FR4	WGQGTTTVTVSS

TABLA 4: Secuencias del aceptor de la cadena ligera

SEQ ID No.	Región de la proteína	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
96	A20&JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
97	A20&JK4 FR2	WYQQKPGKVPKLLIY
98	A20&JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYC
99	A20&JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
96	III-3R&JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
114	III-3R&JK4 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
100	III-3R&JK4 FR3	GVPSRISGSGSGTDFTFTISLQPEDVATYYC
99	III-3R&JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
10F	A1&JK4 FR1	DVVMTQSPSLPVTLGQPASISC
102	A1&JK4 FR2	WFQQRPGQSPRRLIY
103	A1&JK4 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
99	A1&JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
104	01&JK2 FR1	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISC
105	01&JK2 FR2	WYLQKPGQSPQLLIY
103	01&JK2 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
106	01&JK2 FR4	FGGGTKLEIKR

Como se usa en la presente descripción, el término "gen de anticuerpo de la línea germinal" o "fragmento de gen" se refiere a una secuencia de inmunoglobulina codificada por células no linfoides que no se han sometido al proceso de maduración que conduce a un reordenamiento genético y mutación para la expresión de una inmunoglobulina particular. (Ver, *por ejemplo*, Shapiro y otros, Crit. Rev. Immunol. 22 (3): 183-200 (2002); Marchalonis y otros, Adv Exp Med Biol. 484: 13-30 (2001)). Una de las ventajas proporcionadas por los anticuerpos de la presente invención radica en el reconocimiento de que los genes de anticuerpos de la línea germinal tienen más probabilidades que los genes de anticuerpos maduros de conservar las estructuras de secuencia de aminoácidos esenciales características de los

individuos en la especie, por lo tanto, es menos probable que se reconozcan como una fuente extraña cuando se usa terapéuticamente en esa especie.

Como se usa en la presente descripción, el término residuos "clave" se refiere a ciertos residuos dentro de la región variable que tienen más efecto en la especificidad y/o afinidad de unión de un anticuerpo, en particular un anticuerpo humanizado. Un residuo clave incluye, entre otros, uno o más de los siguientes: un residuo adyacente a una CDR, un sitio de glicosilación potencial (puede ser un sitio de glicosilación N u O), un residuo raro, un residuo capaz de interactuar con el antígeno, un residuo capaz de interactuar con una CDR, un residuo canónico, un residuo de contacto entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera, un residuo dentro de la zona de Vernier y un residuo en la región que se superpone entre la definición de Chothia de una CDR1 de la cadena pesada variable y la definición de Kabat del primer marco de la cadena pesada.

Como se usa en la presente descripción, el término "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo o una variante, derivado, análogo o fragmento del mismo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de interés (por ejemplo, CD40 humano) y que comprende una región marco (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y una región determinante de la complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. Como se usa en la presente descripción, el término "sustancialmente" en el contexto de una CDR se refiere a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, preferentemente al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de una CDR de anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todos al menos uno, y típicamente dos dominios variables (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv) en el que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donante) y todas o sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Preferentemente, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Se describe en la presente descripción, un anticuerpo humanizado que contiene tanto la cadena ligera como también al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. En algunos aspectos de la descripción, un anticuerpo humanizado solo contiene una cadena ligera humanizada. En algunos aspectos de la descripción, un anticuerpo humanizado solo contiene una cadena pesada humanizada. En aspectos específicos, un anticuerpo humanizado solo contiene un dominio variable humanizado de una cadena ligera y/o cadena pesada humanizada.

El anticuerpo humanizado se puede seleccionar de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluidas IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, que incluye, sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y se pueden seleccionar dominios constantes particulares para optimizar las funciones efectoras deseadas mediante el uso de técnicas bien conocidas en la técnica.

Las regiones marco y CDR de un anticuerpo humanizado no necesitan corresponder precisamente con las secuencias parentales, *por ejemplo*, la CDR o el marco consenso del anticuerpo donante puede mutarse mediante sustitución, inserción y/o eliminación de al menos un residuo de aminoácido para que el residuo de la CDR o del marco en ese sitio no corresponda ni al anticuerpo donante ni al marco de consenso. En una modalidad preferida, tales mutaciones, sin embargo, no serán extensas. Usualmente, al menos 80 %, preferentemente al menos 85 %, con mayor preferencia al menos 90 %, y con la máxima preferencia al menos 95 % de los residuos de anticuerpos humanizados corresponderán a los de las secuencias parentales de FR y CDR. Como se usa en la presente descripción, el término "marco consenso" se refiere a la región marco en la secuencia de inmunoglobulina consenso. Como se usa en la presente descripción, el término "secuencia de inmunoglobulina consenso" se refiere a la secuencia formada a partir de los aminoácidos (o nucleótidos) que aparecen con más frecuencia en una familia de secuencias de inmunoglobulina relacionadas (véase, *por ejemplo*, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania 1987). En una familia de inmunoglobulinas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido que se presenta con mayor frecuencia en esa posición en la familia. Si dos aminoácidos se presentan con la misma frecuencia, cualquiera puede incluirse en la secuencia consenso.

Como se usa en la presente descripción, la zona "Vernier" se refiere a un subconjunto de residuos marco que se pueden ajustar a la estructura de CDR y afinar la unión al antígeno como se describe por Foote y Winter (1992, J. Mol. Biol. 224: 487-499). Los residuos de la zona Vernier forman una capa subyacente a las CDR y pueden afectar la estructura de las CDR y la afinidad del anticuerpo.

El término "proteína de unión multivalente" se usa en esta descripción para indicar una proteína de unión que comprende dos o más sitios de unión a antígeno. La proteína de unión multivalente se modifica preferentemente para tener tres o más sitios de unión a antígeno, y generalmente no es un anticuerpo presente de manera natural. El término "proteína de unión multiespecífica" se refiere a una proteína de unión capaz de unir dos o más dianas relacionadas o no relacionadas.

El término "dominio variable dual" o "DVD" o "DVD-Ig", como se usa indistintamente en la presente descripción, son proteínas de unión a antígeno que comprenden dos o más sitios de unión a antígeno y son proteínas de unión tetravalentes o multivalentes. Dichos DVD pueden ser monoespecíficos, *es decir*, capaces de unirse a un antígeno o multiespecíficos, *es decir*, capaces de unirse a dos o más antígenos. Las proteínas de unión DVD que comprenden dos polipéptidos DVD de la cadena pesada y dos polipéptidos DVD de la cadena ligera se refieren a una DVD Ig. Cada mitad de una DVD Ig

comprende un polipéptido DVD de la cadena pesada y un polipéptido DVD de la cadena ligera y dos sitios de unión a antígeno. Cada sitio de unión comprende un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera con un total de 6 CDR involucradas en la unión al antígeno por sitio de unión a antígeno. En un aspecto, las CDR descritas en la presente descripción (por ejemplo, SEQ ID NO: 6, 42 y 8 (cadena pesada) y 21, 11 y 12 (cadena ligera)) se usan en un DVD anti-CD40. En la técnica se conocen ejemplos de estructuras de DVD-Ig y se describen, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos núm. 7,612,181.

Como se usa en la presente descripción, el término "neutralizante" se refiere a la neutralización de la actividad biológica de un receptor de citocina cuando un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, se une específicamente al receptor de citocina. Preferentemente, un anticuerpo neutralizante, o una porción de unión a antígeno del mismo, es un anticuerpo neutralizante cuya unión a hCD40 resulta en la inhibición de una actividad biológica de hCD40. Preferentemente, el anticuerpo neutralizante, o la porción de unión a antígeno del mismo, se une a hCD40 y reduce la actividad biológica de hCD40 en al menos aproximadamente 20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 85 % o más. La inhibición de una actividad biológica de hCD40 por un anticuerpo neutralizante, o una porción de unión a antígeno del mismo, se puede evaluar al medir uno o más indicadores de la actividad biológica de hCD40 bien conocidos en la técnica.

El término "actividad" incluye actividades tales como la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo para un antígeno, por ejemplo, un anticuerpo anti-hCD40 que se une a un antígeno hCD40 y/o la potencia neutralizante de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-hCD40 cuya unión a hCD40 inhibe la actividad biológica de hCD40, *por ejemplo*, la unión de CD40L; la participación en el desarrollo de las células B; la participación en la activación de los linfocitos; la participación en la función de las células presentadoras de antígeno; regular la actividad de las células dendríticas, macrófagos y células B; inducir la producción de citocinas inflamatorias en macrófagos y células dendríticas; regular de manera positiva la presentación antigénica; regular de manera positiva la estimulación de las células T; y promover el cambio de clase de inmunoglobulina en las células B.

Los ensayos ilustrativos para evaluar la actividad de los anticuerpos anti-CD40 de la presente invención incluyen ensayos *in vitro* y *en vivo* como se establece en la presente descripción. Específicamente, los ensayos pueden usarse para determinar si un anticuerpo anti-CD40 es un anticuerpo agonista o antagonista.

Por ejemplo, la unión a CD40 humano y la inhibición de la interacción CD40-CD40L se pueden evaluar mediante el uso de una línea celular que expresa CD40 humano a través de análisis FACS. Las actividades antagonistas y agonistas se pueden evaluar mediante el uso de una línea celular reportera que expresa CD40 que expresa CD40 humano unido a fosfatasa alcalina (AP) mediado por NFκB. Cuando se recibe la señal a través de CD40, la activación de NFκB conduce a la secreción de AP que se mide mediante sustrato colorimétrico. Como un ensayo antagonista ilustrativo, se puede cultivar una línea reportera de CD40 con la línea celular Jurkat que expresa CD40L (para proporcionar la interacción fisiológica del ligando) o con CD40L soluble y se puede evaluar la capacidad de los anticuerpos anti-CD40 para bloquear la señal de NFκB. Como un ensayo agonista ilustrativo, se puede tratar una línea celular reportera de CD40 humana con anticuerpos anti-CD40 y la señal de NFκB medirse como se describió anteriormente.

Alternativamente, se puede utilizar un ensayo agonista de células B en el que las células B se activan con dosis bajas de anti-IgM e IL4, antes de la adición de un anticuerpo antagonista de CD40. La potenciación de la activación de las células B puede medirse como una regulación positiva de CD86, que a su vez es indicativo de la actividad agonista. De manera similar, se puede utilizar un ensayo antagonista de células B en el que las células B humanas primarias se cultivan con una línea de células T humanas que expresa CD40L que conduce a la activación de las células B y la regulación positiva de la expresión de CD86 a través de la interacción CD40/CD40L. La inhibición de la regulación positiva de CD86 de las células B humanas primarias es indicativa de la actividad antagonista.

El término "epítipo" incluye cualquier determinante de polipéptido capaz de unirse específicamente a un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo. En ciertas modalidades, los determinantes del epítipo incluyen agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo o sulfonilo y, en ciertas modalidades, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. En diversas modalidades, un epítipo puede ser un epítipo lineal o secuencial, *es decir*, una secuencia lineal de aminoácidos, de la estructura primaria del antígeno, *es decir*, CD40. Alternativamente, en otras modalidades, un epítipo puede ser un epítipo conformacional que tiene una forma tridimensional específica cuando el antígeno asume su estructura secundaria. Por ejemplo, el epítipo conformacional puede comprender aminoácidos no lineales, *es decir*, no secuenciales, del antígeno.

En una modalidad particular, un epítipo es una región de un antígeno que está unida por un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo. En ciertas modalidades, se dice que un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

El término "anticuerpo humano", como se usa en la presente descripción, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o

por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDR y en particular CDR3. Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa en la presente descripción, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se hayan injertado en secuencias marco humanas.

El término "anticuerpo humano recombinante", como se usa en la presente descripción, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados con el uso de un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped (descrito más adelante en la Sección II C, a continuación), anticuerpos aislados de una biblioteca recombinante, combinatoria de anticuerpos humanos (Hoogenboom HR, (1997) TIB Tech. 15: 62-70; Azzazy H. y Highsmith WE, (2002) Clin. Biochem. 35: 425-445; Gaviñondo JV y Larrick JW (2002) BioTechniques 29: 128-145; Hoogenboom H. y Chames P. (2000) Immunology Today 21: 371-378), anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase, *por ejemplo*, Taylor, LD, y otros (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295; Kellermann SA. Y Green LL (2002) Current Opinion in Biotechnology 13: 593-597; Little M. et al (2000) Immunology Today 21: 364-370) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique la unión de secuencias de genes de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Sin embargo, en ciertos aspectos, tales anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas y relacionadas con las secuencias VH y VL de la línea germinal humana, pueden no presentarse de manera natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*. Un aspecto proporciona anticuerpos completamente humanos capaces de unirse a CD40 humano que pueden generarse mediante el uso de técnicas bien conocidas en la técnica, tales como, pero sin limitación, el uso de bibliotecas de fagos de Ig humana tales como las descritas en Jermutus y otros, Publicación PCT núm. WO 2005/007699 A2.

El término "resonancia de plasmones de superficie", como se usa en la presente descripción, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de las interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz biosensora, por ejemplo mediante el uso del sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para más descripciones, véase Jönsson, U., y otros (1993) Ann. Biol. Clin. 51: 19-26; Jönsson, U., y otros (1991) Biotechniques 11: 620-627; Johnsson, B. y otros (1995) J. Mol. Recognit. 8: 125-131; y Johnsson, B., y otros (1991) Anal. Biochem. 198: 268-277.

El término " k_{on} ", como se usa en la presente descripción, pretende referirse a la constante de velocidad para la asociación de un anticuerpo al antígeno para formar el complejo anticuerpo/antígeno como se conoce en la técnica.

El término " k_{off} ", como se usa en la presente descripción, pretende referirse a la constante de velocidad para la disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno como se conoce en la técnica.

El término " K_D ", como se usa en la presente descripción, pretende referirse a la constante de disociación de una interacción de anticuerpo-antígeno particular como se conoce en la técnica.

El término "anticuerpo etiquetado" como se usa en la presente descripción, se refiere a un anticuerpo con una etiqueta incorporada que proporciona la identificación del anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo. Preferentemente, la etiqueta es un marcador detectable, *por ejemplo*, la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la unión a un polipéptido de restos biotínico que pueden detectarse mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse mediante métodos ópticos o colorimétricos). Los ejemplos de etiquetas para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, 3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , o ^{153}Sm); marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, luciferasa, fosfatasa alcalina); marcadores quimioluminiscentes; grupos biotínico; epítopos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un reportero secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión secundarios para anticuerpos, dominios de unión a metales, etiquetas de epítopo); y agentes magnéticos, como los quelatos de gadolinio.

Los términos "cristal" y "cristalizado", como se usan en la presente descripción, se refieren a un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, que existe en forma de un cristal. Los cristales son una forma del estado sólido de la materia, que es diferente de otras formas, tales como el estado sólido amorfo o el estado cristalino líquido. Los cristales se componen de matrices tridimensionales regulares y repetitivas de átomos, iones, moléculas (por ejemplo, proteínas tales como anticuerpos) o conjuntos moleculares (por ejemplo, complejos antígeno/anticuerpo). Estas matrices tridimensionales se organizan de acuerdo con relaciones matemáticas específicas que se comprenden bien en el campo. La unidad fundamental, o bloque de construcción, que se repite en un cristal se llama unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en una disposición que se ajusta a una simetría cristalográfica bien definida y determinada proporciona la "celda unitaria" del cristal. La repetición de la celda unitaria mediante traducciones regulares en las tres dimensiones proporciona el cristal. Ver Giege, R. y Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2da., págs. 20 1-16, Oxford University Press, Nueva York, Nueva York, (1999)".

El término "polinucleótido", como se usa en la presente descripción, se refiere a una forma polimérica de dos o más nucleótidos, ya sea ribonucleótidos o desoxinucleótidos, o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de ADN monocatenario y bicatenario, pero preferentemente es ADN bicatenario.

El término "polinucleótido aislado", como se usa en la presente descripción, significará un polinucleótido (por ejemplo, genómico, ADNc o de origen sintético, o alguna combinación de los mismos) que, en virtud de su origen, el "polinucleótido aislado": no está asociado con todos o una porción de un polinucleótido con el que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza; está operativamente unido a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza; o no se presenta en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

El término "vector", como se usa en la presente descripción, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle circular de ADN bicatenario en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde segmentos de ADN adicionales pueden ligarse al genoma viral. Ciertos vectores son capaces de la replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y de este modo se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Tales vectores se denominan en la presente descripción "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante a menudo están en forma de plásmidos. En la presente descripción, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector más usada. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuosos de replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que cumplen funciones equivalentes.

El término "operativamente unido" se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera pretendida. Una secuencia de control "operativamente unida" a una secuencia codificante se liga de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se logra en condiciones compatibles con las secuencias de control. Las secuencias "operativamente unidas" incluyen tanto secuencias de control de la expresión que son contiguas con el gen de interés como secuencias de control de la expresión que actúan en *trans* o a distancia para controlar el gen de interés. El término "secuencia de control de la expresión" como se usa en la presente descripción se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que están ligadas. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias apropiadas de iniciación, terminación, promotoras y potenciadoras de la transcripción; señales eficientes de procesamiento de ARN tales como señales de empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que potencian la eficiencia de la traducción (es decir, la secuencia consenso de Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de la proteína; y cuando se desee, secuencias que potencian la secreción de proteínas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere en dependencia del organismo huésped; en procariotas, tales secuencias de control generalmente incluyen el promotor, el sitio de unión al ribosoma y la secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotas, generalmente, tales secuencias de control incluyen promotores y secuencia de terminación de la transcripción. El término "secuencias de control" pretende incluir componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líderes y secuencias asociadas a la fusión. Los constructos de proteínas de la presente invención pueden expresarse y purificarse mediante el uso de vectores de expresión y células huésped conocidas en la técnica, que incluyen casetes de expresión, vectores, células huésped recombinantes y métodos para la expresión recombinante y el procesamiento proteolítico de poliproteínas y preproteínas recombinantes de un marco abierto de lectura único (por ejemplo, el documento WO 2007/014162).

"Transformación", como se define en la presente descripción, se refiere a cualquier proceso por el cual el ADN exógeno entra en una célula huésped. La transformación puede ocurrir en condiciones naturales o artificiales mediante el uso de diversos métodos bien conocidos en la técnica. La transformación puede depender de cualquier método conocido para la inserción de secuencias de ácido nucleico extrañas en una célula huésped procariota o eucariota. El método se selecciona en función de la célula huésped a transformar y puede incluir, pero sin limitarse a, infección viral, electroporación, lipofección y bombardeo de partículas. Tales células "transformadas" incluyen células establemente en las que el ADN insertado es capaz de replicarse como un plásmido de replicación autónoma o como parte del cromosoma del huésped. También incluyen células que expresan transitoriamente el ADN o ARN insertado durante períodos limitados de tiempo.

El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), como se usa en la presente descripción, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido ADN exógeno. Debe entenderse que tales términos están destinados a referirse no solo a la célula sujeto particular, sino a la progenie de tal célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en las generaciones siguientes debido a mutaciones o influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aún se incluye dentro del alcance del término "célula huésped" como se usa en la presente descripción. Preferentemente, las células huésped incluyen células procariotas y eucariotas seleccionadas de cualquiera de los Reinos de la vida. Las células eucariotas preferidas incluyen células protistas, fúngicas, vegetales y animales. Con la máxima preferencia, las células huésped incluyen, pero no se limitan a, la línea celular

procariótica *E. Coli*; líneas celulares de mamífero CHO, HEK 293 y COS; la línea celular de insecto Sf9; y la célula fúngica *Saccharomyces cerevisiae*.

Se pueden usar técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se pueden realizar de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se logra comúnmente en la técnica o como se describe en la presente descripción. Las técnicas y procedimientos anteriores pueden realizarse generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente descripción. Ver, *por ejemplo*, Sambrook y otros Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2da ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)).

"Organismo transgénico", como se conoce en la técnica y como se usa en la presente descripción, se refiere a un organismo que tiene células que contienen un transgén, en donde el transgén introducido en el organismo (o un antepasado del organismo) expresa un polipéptido no expresado de manera natural en el organismo. Un "transgén" es un constructo de ADN, que se integra de manera estable y operativa en el genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla un organismo transgénico, que dirige la expresión de un producto génico codificado en uno o más tipos de células o tejidos del organismo transgénico.

El término "regular" y "modular" se usan indistintamente y, como se usa en la presente descripción, se refiere a un cambio o una alteración en la actividad de una molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de hCD40). La modulación puede ser un aumento o una disminución en la magnitud de una determinada actividad o función de la molécula de interés. Las actividades y funciones ilustrativas de una molécula incluyen, pero no se limitan a, características de unión, actividad enzimática, activación del receptor celular y transducción de señales.

En consecuencia, el término "modulador", como se usa en la presente descripción, es un compuesto capaz de cambiar o alterar una actividad o función de una molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de hCD40). Por ejemplo, un modulador puede causar un aumento o disminución en la magnitud de una determinada actividad o función de una molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del modulador. En ciertos aspectos, un modulador es un inhibidor, que disminuye la magnitud de al menos una actividad o función de una molécula. Los inhibidores ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, anticuerpos, peptidocuerpos, carbohidratos o pequeñas moléculas orgánicas. Los péptidos se describen, *por ejemplo*, en el documento WO01/83525.

Como se usa en la presente descripción, el término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de una terapia que es suficiente para reducir o mejorar la gravedad y/o la duración de un trastorno o uno o más síntomas del mismo, prevenir el avance de un trastorno, causar la regresión de un trastorno, prevenir la recurrencia, desarrollo, aparición o progresión de uno o más síntomas asociados con un trastorno, detectar un trastorno o potenciar o mejorar el(los) efecto(s) profiláctico(s) o terapéutico(s) de otra terapia (*por ejemplo*, agente profiláctico o terapéutico).

Como se usa en la presente descripción, el término "no respondedor" se usa para referirse a un sujeto que tiene IBD (por ejemplo, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa) que no tiene mejora, o limitada o inadecuada, en su estado clínico de la enfermedad después del tratamiento con un inhibidor de TNFα (*por ejemplo*, falta de reducción en la puntuación de CDAI, falta de reducción en el uso de corticosteroides). En una modalidad, un no respondedor a TNF es un sujeto con IBD que no logra una reducción de 100 puntos o más en su puntuación del Índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn (CAI) después del tratamiento con un inhibidor de TNFα. En una modalidad, un no respondedor es un sujeto que tiene IBD que no logra una reducción de 100 puntos o más en su puntuación del Índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn (CAI) en un marco de tiempo específico después del tratamiento con un inhibidor de TNFα.

I. Anticuerpos que se unen a CD40 humano (hCD40)

La presente invención proporciona anticuerpos antagonistas humanizados que se unen a CD40, incluido CD40 humano (hCD40). También se describen en la presente descripción anticuerpos monoclonales murinos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen a CD40, así como anticuerpos quiméricos que comprenden las regiones variables de los anticuerpos murinos anti-CD40 descritos en la presente descripción. Preferentemente, los anticuerpos de la invención son anticuerpos antagonistas anti-CD40 (por ejemplo, anti-CD40 humano) que no tienen actividad agonista significativa.

1. Anticuerpos Antagonistas Anti-hCD40 Humanizados Derivados del Anticuerpo 1 (Ab1)

La invención se basa, al menos en parte, en la identificación de anticuerpos anti-CD40 humanizados que tienen características antagonistas y, en ciertas modalidades, que no tienen actividad agonista sustancial.

Como se describe en el Ejemplo 1, se identificaron tres anticuerpos murinos anti-hCD40 antagonistas, *es decir*, Ab1 (secuencia VL descrita en SEQ ID NO: 9 y secuencia VH descrita en SEQ ID NO: 5), Ab2 (secuencia VL descrita en SEQ ID NO: 76 y secuencia VH descrita en la SEQ ID NO: 75), y Ab3 (secuencia VL descrita en la SEQ ID NO: 48 y secuencia VH descrita en la SEQ ID NO: 44).

Las secuencias CDR consenso se determinaron en base a alineamientos de las secuencias de aminoácidos de CDR de los anticuerpos antagonistas murinos Ab1, Ab2 y Ab3. Las secuencias de aminoácidos consenso para las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de VH se describen en SEQ ID NOS 78, 79 y 80, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos consenso para las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de VL se describen en SEQ ID NO 108, 109 y 110, respectivamente. Todas las secuencias también se describen a continuación en la Tabla 5 y en la Figura 4.

Tabla 5. Alineamientos de secuencia de aminoácidos de CDR de anti-CD40 de hibridoma

	Hibridoma	CDR1	CDR2	CDR3
	Ab3 Ab1 Ab2 Consenso	GYTFTSYTMH GFTFSDYGMN GFTFSDYGMN GFTFSDYGMN Y TS TH	YINPSSDYPNYNQKFKD YISSGRSNIYYADTVKG YISSGRGNIYYADTVKG YISSGR NIYYADTVKG NPSS YPN NQKF D	WGYSFDY SWG YFDV SWG YFDV SWG YFDV WGYS
Cadena pesada (SEQ ID NOS 45-47, 6-8, 6, 42, 8 y 78-80, respectivamente, en orden de aparición)				
Cadena ligera (SEQ ID NOS 49-51, 10-12, 10-12 y 108-110, respectivamente, en orden de aparición)	Ab3 Ab1 Ab2 Consenso	RSSKSLLHS-NGNTYLY KSSQSLLNSGNQKNYLT KSSQSLLNSGNQKNYLT KSSQSLLNSGNQKNYLT RKH - GNT Y	RMSTLAS WASTRES WASTRES WASTRES RM LA	MQHLEYPLT QNDYTYPLT QNDYTYPLT QNDYTYPLT MQHLE

La secuencia de aminoácidos consenso del dominio CDR1 de la cadena pesada se establece como SEQ ID NO: 78 (G(F/Y)TF(S/T)(D/S)Y(G/T)M(N/H)). La secuencia de aminoácidos consenso del dominio CDR2 de la cadena pesada variable se establece como SEQ ID NO: 79 (YI(S/N)(S/P)(G/S)(R/S) (D/S/G)(N/Y)(I/P) (Y/N)Y(A/N)(D/Q)(T/K) (V/F)K(G/D)). La secuencia de aminoácidos consenso del dominio CDR3 de la cadena pesada variable se establece en SEQ ID NO: 80 ((S/W)(W/G)(G/Y)(Y/S)FDV).

La secuencia de aminoácidos consenso del dominio CDR1 de la cadena ligera variable se establece como SEQ ID NO: 108 ((K/R)SS(Q/K)SLL(N/H)S(G/-)N(Q/G) (K/N)(N/T)YL(T/Y)). La secuencia de aminoácidos consenso del dominio CDR2 de la cadena ligera variable se establece como SEQ ID NO: 109 ((W/R)(A/M) ST (R/L) (E/A)S). La secuencia de aminoácidos consenso del dominio CDR3 de la cadena ligera variable se establece como SEQ ID NO: 110 ((Q/M)(N/Q) (D/H)(Y/L)(T/E)YPLT).

En un aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo antagonista anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una cadena ligera variable que comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 108, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 109, una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 110, y que comprende una cadena pesada variable que comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80.

Después de la identificación de los anticuerpos murinos Ab1, Ab2 y Ab3, se seleccionaron los anticuerpos Ab1 y Ab3 para la humanización (que se describe a continuación en el Ejemplo 2). Las tablas 11 y 12 proporcionan las secuencias de aminoácidos de las regiones CDR, VH y VL de Ab1 y Ab3 humanizados, respectivamente. Específicamente, se crearon nueve anticuerpos humanizados diferentes basados en Ab3 (véase el Ejemplo 2 y la Tabla 12 a continuación). También se crearon cuatro anticuerpos humanizados diferentes basados en Ab1, que incluyen los siguientes:

A) huAb1VH.1 / VL.1 (secuencia de aminoácidos de VH establecida como SEQ ID NO: 13 y secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de VH establecidas como SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente; y secuencia de aminoácidos VL establecida como SEQ ID NO: 14 y secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de VL establecidas como SEQ ID NO: 10, 11 y 12, respectivamente);

B) huAb1VH.1A/VL.1 (secuencia de aminoácidos de VH establecida como SEQ ID NO: 15 y secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de VH establecidas como SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente; y secuencia de aminoácidos de VL establecida como SEQ ID NO: 14 y secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de VL establecidas como SEQ ID NO: 10, 11 y 12, respectivamente);

C) huAb1VH.1/VL.1A (secuencia de aminoácidos de VH establecida como SEQ ID NO: 13 y secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de VH establecidas como SEQ ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente; y secuencia de aminoácidos de VL establecida como SEQ ID NO: 16 y secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de VL establecidas como SEQ ID NO: 10, 11 y 12, respectivamente); y

D) huAb1VH.1A/VL.1A (secuencia de aminoácidos de VH establecida como SEQ ID NO: 15 y secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de VH establecidas como SEQ ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente; secuencia de aminoácidos de VL establecida como SEQ ID NO: 16 y secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de VL establecidas como SEQ ID NO: 10, 11 y 12, respectivamente).

Las versiones humanizadas de Ab1 se modificaron adicionalmente para eliminar un posible sitio de desamidación en la CDR1 de la cadena ligera. Se analizaron seis variantes de anticuerpos huAb1, y cuatro de los anticuerpos se identificaron como antagonistas de CD40. Los seis anticuerpos se denominan en la presente descripción Ab1v1, Ablv2, Ablv3, Ablv4, Ablv5 y Ablv6 (en la Tabla 13 a continuación se proporcionan las secuencias CDR y variables). De las seis variantes de Ab1 humanizado, se seleccionó huAb1v1 por tener una actividad antagonista particularmente superior. La secuencia variable de la cadena pesada de huAb1v1 se proporciona en SEQ ID NO: 15 con las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 descritas en SEQ ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente. La secuencia variable de la cadena ligera de huAb1v1 se proporciona en SEQ ID NO: 20 con las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 descritas en SEQ ID NOs: 21, 11 y 12, respectivamente.

La CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo huAb1v1 se mutagenizó adicionalmente dando como resultado diecisiete variantes (descritas a continuación en el Ejemplo 4). Estas variantes de CDR2 de la cadena pesada de huAb1v1 se denominan en esta descripción como huAb1v1CDR2v1 a huAb1v1CDR2v17. Las secuencias de las cadenas pesadas de huAb1v1CDR2v1 a huAb1v1CDR2v17 se proporcionan en la Tabla 16, donde se seleccionó VH de huAb1v1CDR2v7 como el clon que tiene una actividad antagonista particularmente superior contra CD40, mientras que permanece relativamente libre de actividad agonista. La secuencia variable de la cadena pesada de huAb1v1CDR2v7 se proporciona en SEQ ID NO: 28 con las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 descritas en SEQ ID NO: 6, 42 y 8, respectivamente.

Después de la selección de huAb1v1CDR2v7 VH (VH de SEQ ID NO: 28 con las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 descritas en SEQ ID NOs: 6, 42 y 8, respectivamente) y huAb1v1 VL (VL de SEQ ID NO: 20 con las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 descritas en las SEQ ID NOs: 21, 11 y 12, respectivamente), las regiones variables se clonaron en dos fondos de IgG diferentes que dieron como resultado dos anticuerpos antagonistas anti-CD40, *es decir*, Ab101 y Ab102. La Tabla 6 (y la Tabla 19) proporcionan secuencias de la cadena pesada y cadena ligera de longitud completa para aspectos particulares de la descripción relacionados con estos anticuerpos IgG. En la Tabla 6, las regiones constantes están subrayadas y los dominios CDR están en negrita.

TABLA 6: Anticuerpos humanizados anti-CD40 Ab101 y Ab102 y secuencias de la cadena pesada y ligera de los mismos

Ab	Secuencia de la cadena pesada	HC SEQ ID NO:	Secuencia de la cadena ligera	LC SEQ ID NO:
Ab101	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMN WVRQAPGKGLEWIA YISSGR NIYY ADTVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAR SWG YFDVWGQGTITVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDLMISRTPETVCWVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR WSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAP IEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	39	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLL NRGNQKN YLTWFQKPGQPPKLLIYW ASTR ESG VPDRFSGSGGTDFLTITSSSLQAEDVA VYYC QNDYTYPL TFGQG TKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASWCCLLNIFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYTS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	40
Ab102	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMN WVRQAPGKGLEWIA YISSGR NIYY ADTVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAR SWG YFDVWGQGTITVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDLMISRTPETVCWVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR WSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAP IEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK	41	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLL NRGNQKN YLTWFQKPGQPPKLLIYW ASTR ESG VPDRFSGSGGTDFLTITSSSLQAEDVA VYYC QNDYTYPL TFGQG TKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASWCCLLNIFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYTS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	40

En consecuencia, la presente invención se dirige a un anticuerpo antagonista anti-CD40 que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 40 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: NO : 41 (Ab102). También se describe un anticuerpo antagonista anti-CD40 que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 40 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: NO: 39 (Ab101).

Por lo tanto, la descripción incluye anticuerpos anti-CD40 murinos, quiméricos y humanizados que tienen actividad antagonista. En ciertos aspectos, la presente descripción proporciona un anticuerpo antagonista anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, que incluye una región variable de la cadena ligera que tiene una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 12 y/o una región variable de la cadena pesada que tiene una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 8. En particular, el anticuerpo antagonista anti-CD40 de la invención incluye una CDR1 de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 6, una CDR2 de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 42, una CDR3 de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 8, una CDR1 de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 21, una CDR2 de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 11, y una CDR3 de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 12. En particular, el anticuerpo antagonista anti-CD40 de la invención incluye un dominio variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 28 y un dominio variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 20. En particular, el anticuerpo antagonista anti-CD40 de la invención incluye una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 41; y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 40. También se describen en la presente descripción anticuerpos antagonistas anti-CD40, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que incluyen una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 39; y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 40.

Los anticuerpos que tienen las secuencias de aminoácidos (variable o CDR) descritas en las Tablas 5, 6, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18 y 19 se incluyen en la descripción. En consecuencia, en un aspecto, la presente descripción se dirige a un anticuerpo antagonista anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, que tiene una región variable de la cadena ligera que comprende (a) una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 10, 17, 19 o 21; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 11; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 12. Alternativamente o en combinación, el anticuerpo antagonista anti-CD40, o la porción de unión a antígeno del mismo, incluye una región variable de la cadena pesada que comprende (a) una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 6; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 7 o 42; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 8.

En un aspecto particular de la descripción, el anticuerpo antagonista anti-CD40, o la porción de unión a antígeno del mismo, tiene una región variable de la cadena ligera que comprende (a) una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 10; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 11; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 12; y una región variable de la cadena pesada que comprende (a) una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 6; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 7; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 8.

En otro aspecto de la descripción, el anticuerpo antagonista anti-CD40, o la porción de unión a antígeno del mismo, tiene una región variable de la cadena ligera que comprende (a) una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 19; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 11; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 12; y una región variable de la cadena pesada que comprende (a) una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 6; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 7; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 8.

En otro aspecto de la descripción, el anticuerpo antagonista anti-CD40, o la porción de unión a antígeno del mismo, tiene una región variable de la cadena ligera que comprende (a) una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 17; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 11; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 12; y una región variable de la cadena pesada que comprende (a) una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 6; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 7; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 8.

En otro aspecto de la descripción, el anticuerpo antagonista anti-CD40, o la porción de unión a antígeno del mismo, tiene una región variable de la cadena ligera que comprende (a) una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 21; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 11; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 12; y una región variable de la

cadena pesada que comprende (a) una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 6; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 7; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 8.

5 En otro aspecto de la descripción, el anticuerpo antagonista anti-CD40, o la porción de unión a antígeno del mismo, tiene una región variable de la cadena ligera que comprende (a) una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 21; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 11; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 12; y una región variable de la
10 cadena pesada que comprende (a) una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 6; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 42; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 8.

En otro aspecto de la descripción, el anticuerpo antagonista anti-CD40, o la porción de unión a antígeno del mismo, tiene una región variable de la cadena ligera que comprende (a) una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 108; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 109; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 110; y una región variable de la
15 cadena pesada que comprende (a) una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 78; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 79; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 80.

20 En otro aspecto más de la descripción, un anticuerpo antagonista anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de la cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 5, 13, 15 o 22-38 ; y/o una región variable de la cadena ligera que incluye una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 9, 14, 16, 18, 20 o 43.

25 En un aspecto particular de la descripción, el anticuerpo antagonista anti-CD40, o la porción de unión a antígeno del mismo, incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 5 y una región variable de la cadena ligera que incluye una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 9.

30 En otro aspecto de la descripción, el anticuerpo antagonista anti-CD40, o la porción de unión a antígeno del mismo, incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 13 y una región variable de la cadena ligera que incluye una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 14, 16 o 18.

35 En otro aspecto de la descripción, el anticuerpo antagonista anti-CD40, o la porción de unión a antígeno del mismo, incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 15 y una región variable de la cadena ligera que incluye una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20 o 43.

40 En otro aspecto de la descripción, el anticuerpo antagonista anti-CD40, o la porción de unión a antígeno del mismo, incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 28 y una región variable de la cadena ligera que incluye una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 20.

45 Los anticuerpos descritos en la presente descripción, particularmente el anticuerpo Ab102, tienen actividad antagonista sin actividad agonista sustancial para CD40. Por lo tanto, en la descripción se incluyen anticuerpos que se unen al epítipo reconocido por los anticuerpos Ab102 y Ab101. En un aspecto particular, la descripción incluye un anticuerpo aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se
50 une a CD40 humano de manera que CD40 con dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, unido a un epítipo definido por las regiones topográficas Cys62-Phe67, Gln79-Cys83, Arg90-Thr99 y Thr24-Cys37 de SEQ ID NO: 1 se inhiben de la unión al ligando CD40 (CD40L). En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, capaz de unirse a CD40 humano que se une a un epítipo en CD40 humano que comprende tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete,
55 dieciocho, diecinueve, veinte, veintiuno, veintidós, veintitrés, veinticuatro, veinticinco, veintiséis, veintisiete, veintiocho, veintinueve, treinta, treinta y uno, treinta y dos, treinta y tres, treinta y cuatro, o todos los residuos de aminoácidos Cys62-Phe67 (Cys62, Gly63, Glu64, Ser65, Glu66, Phe67), Gln79-Cys83 (Gln79, His 80, Lys81, Tyr82, Cys83), Arg90-Thr99 (Arg90, Val91, Gln92, Gln93, Lys94, Gly95, Thr96, Ser97, Glu98 and Thr99), y Thr24-Cys37 (Thr24, Ala25, Cys26, Arg27, Glu28, Lys29, Gln30, Tyr31, Leu32, Ile33, Asn34, Ser35, Gln36, Cys37) de SEQ ID NO: 1.

60 En otro aspecto, la presente descripción proporciona una región CDR2 de la cadena pesada que tiene actividad antagonista contra CD40. En particular, el residuo 55 (residuo X) de la secuencia de aminoácidos de VH CDR2 YISSGRXNIYYADTVKG (SEQ ID NO: 112) se ha identificado que desempeña un papel en el aumento de la actividad antagonista del anticuerpo con relación a una secuencia CDR2 parental que tiene el residuo S55. Los residuos Thr, Asp, Val, Leu, Ile y Met en la posición 55 de HC CDR2 resultan en niveles más bajos de actividad antagonista con relación a
65 otros aminoácidos en la posición 55. En un aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo antagonista anti-CD40, o

una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 111 y una región variable de la cadena ligera que comprende una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. Las secuencias de aminoácidos del dominio CDR1 y CDR3 que se pueden combinar con SEQ ID NO: 111 en las cadenas de anticuerpos pesadas y ligeras variables se describen en todas partes, incluidas, por ejemplo, las Tablas 13 y 18.

En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona una región CDR1 de la cadena ligera que tiene un residuo identificado como un interruptor antagonista/agonista. Como se describe a continuación en el Ejemplo 3, la modificación del motivo "NS" de la región VL CDR1 KSSQSLLNSGNQKNYLT (SEQ ID NO: 10) en el residuo "S" puede resultar en un anticuerpo antagonista que cambia a un anticuerpo agonista. Por lo tanto, en una modalidad, la invención incluye un anticuerpo antagonista anti-CD40 que tiene una región CDR1 VL que comprende la SEQ ID NO: 113 (KSSQSLLNXGNQKNYLT; en donde X no es el residuo de aminoácido Pro).

El término "anticuerpos competidores" en la presente descripción se refiere a cualquier número de anticuerpos que se dirigen a la misma entidad supermolecular molecular o unida de manera estable pero no covalentemente, preferentemente la misma molécula, *es decir*, CD40, en donde al menos uno es capaz de reducir específicamente la unión medible de otro, preferentemente obstaculizando estéricamente el acceso del otro a su epítipo diana (descrito anteriormente) o induciendo y/o estabilizando una conformación en la entidad diana que reduce la afinidad de la diana por el otro anticuerpo, con mayor preferencia bloqueando directamente el acceso al epítipo diana del otro uniéndose a un epítipo en proximidad suficientemente cercana del primero, que se superpone con el primero o idéntico al primero, con mayor preferencia que se superpone o idéntico, en particular idéntico. Se dice que dos epítopos se "superponen" si comparten parte de sus estructuras químicas, preferentemente sus secuencias de aminoácidos, y son "idénticos", si sus estructuras químicas, preferentemente sus secuencias de aminoácidos, son idénticas.

En aspectos particulares, el anticuerpo competidor, o la porción de unión a antígeno del mismo, es un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, que compete con cualquiera de los anticuerpos presentados en la presente descripción. En un aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo competidor que puede competir con los anticuerpos descritos en la presente descripción (por ejemplo, Ab101 o Ab102) y se une a un epítipo topográfico de CD40 humano que incluye los residuos Cys62-Phe67, Gln79-Cys83, Arg90-Thr99 y Thr24-Cys37.

En aspectos particulares, el anticuerpo agonista comprende una región variable de la cadena pesada que incluye (a) una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 6; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 7; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 8; y una región variable de la cadena ligera que incluye (a) una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 74; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 11; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 12.

En otros aspectos particulares, el anticuerpo agonista comprende una región variable de la cadena pesada que incluye (a) una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 6; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 7; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 8; y una región variable de la cadena ligera que incluye (a) una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 17; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 11; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 12.

En aspectos adicionales, un anticuerpo agonista anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de la cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 15 o 13; y/o una región variable de la cadena ligera que incluye una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 77 o 43.

2. Anticuerpos humanizados anti-CD40 derivados del anticuerpo 3 (Ab3)

Las secuencias de aminoácidos para las versiones humanizadas de las cadenas pesadas y ligeras de Ab3 murino se proporcionan en la Tabla 11 a continuación. Por lo tanto, la descripción presenta además anticuerpos que comprenden las secuencias variables y/o CDR del anticuerpo 3 (Ab3).

En un aspecto, la presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que incluye una región variable de la cadena ligera que incluye (a) una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 49; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 50; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 51; y una región variable de la cadena pesada que incluye (a) una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 45; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 46; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 47.

En consecuencia, en un aspecto, la presente descripción se dirige a un anticuerpo antagonista anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, que tiene una región variable de la cadena ligera que incluye (a) una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 49; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos

como se establece en SEQ ID NO: 50; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 51. Alternativamente o en combinación, el anticuerpo antagonista anti-CD40, o la porción de unión a antígeno del mismo, incluye una región variable de la cadena pesada que incluye (a) una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 45; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 46; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 47.

En otro aspecto más de la presente descripción, un anticuerpo antagonista anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de la cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 44, 52, 54 o 55; y/o una región variable de la cadena ligera que incluye una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 48, 53, 56 o 57.

En un aspecto particular, el anticuerpo antagonista anti-CD40, o la porción de unión a antígeno del mismo, incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 44 y una región variable de la cadena ligera que incluye una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 48.

En otro aspecto, el anticuerpo antagonista anti-CD40, o la porción de unión a antígeno del mismo, incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 52 y una región variable de la cadena ligera que incluye una secuencia de aminoácidos como establecido en SEQ ID NO: 53, 56 o 57.

En otro aspecto, el anticuerpo antagonista anti-CD40, o la porción de unión a antígeno del mismo, incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 54 y una región variable de la cadena ligera que incluye una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 53, 56 o 57.

En otro aspecto, el anticuerpo antagonista anti-CD40, o la porción de unión a antígeno del mismo, incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 55 y una región variable de la cadena ligera que incluye una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 53, 56 o 57.

3. Anticuerpos quiméricos anti CD40

Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo se derivan de diferentes especies animales, tal como los anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. Véase, *por ejemplo*, Morrison, Science 229: 1202 (1985); Oi y otros, BioTechniques 4:214 (1986); Gillies y otros, (1989) J. Immunol. Methods 125: 191-202; patentes de Estados Unidos núms. 5,807,715; 4,816,567; y 4,816,397. Además, las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison y otros, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 85855; Neuberger y otros, 1984, Nature 312: 604-608; Takeda y otros, 1985, Nature 314: 452-454) mediante el empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada.

En otro aspecto, la presente descripción se dirige a un anticuerpo antagonista anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, que tiene una región variable de la cadena ligera que incluye (a) una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 10; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 11; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 12; y una región variable de la cadena pesada que incluye (a) una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 6; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 42; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 8. En un aspecto particular, el anticuerpo antagonista anti-CD40, o la porción de unión a antígeno del mismo, tiene una región variable de la cadena ligera que incluye la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 76 y una región variable de la cadena pesada que incluye la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 75.

En otro aspecto, la presente descripción se dirige a un anticuerpo antagonista anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, que tiene una región variable de la cadena ligera que incluye (a) una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 49; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 50; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 51; y una región variable de la cadena pesada que incluye (a) una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 45; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 46; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 47. En un aspecto particular, el anticuerpo antagonista anti-CD40, o la porción de unión a antígeno del mismo, tiene una región variable de la cadena ligera que incluye la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 48 y una región variable de la cadena pesada que incluye la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 44.

En otro aspecto, la presente descripción se dirige a un anticuerpo antagonista anti-CD40, o la porción de unión a antígeno del mismo, que tiene una región variable de la cadena ligera que incluye (a) una CDR1 que tiene una secuencia de

aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 10; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 11; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 12; y una región variable de la cadena pesada que incluye (a) una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 6; (b) una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 7; y (c) una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 8. En un aspecto particular, el anticuerpo antagonista anti-CD40, o la porción de unión a antígeno del mismo, tiene una región variable de la cadena ligera que incluye la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 9 y una región variable de la cadena pesada que incluye la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 5.

Las secuencias CDR de los anticuerpos anti-CD40 aislados anteriores establecen una nueva familia de anticuerpos CD40, o porciones de unión a antígeno de los mismos, aislados de acuerdo con esta invención, e incluyen anticuerpos que incluyen las secuencias CDR enumeradas en las Tablas 5, 11-13 y 15-18. Para generar y seleccionar las CDR de la invención que tienen actividad de unión y/o neutralización de CD40 preferida con relación a hCD40, los métodos estándar conocidos en la técnica para generar anticuerpos de la presente descripción y evaluar las características de unión y/o neutralización de CD40 de esos anticuerpos pueden usarse, incluidos, pero sin limitarse a, los específicamente descritos en la presente descripción.

4. Caracterización de anticuerpos de la invención

Los anticuerpos anti-CD40 de la presente invención son anticuerpos antagonistas y pueden exhibir una alta capacidad para reducir o neutralizar la actividad de CD40, *por ejemplo*, según lo evaluado por cualquiera de varios ensayos *in vitro* e *in vivo* conocidos en la técnica y como se describe en la presente descripción. En ciertas modalidades, los anticuerpos anti-CD40 de la invención son antagonistas y están sustancialmente libres de actividad agonista. La actividad antagonista y agonista puede determinarse mediante ensayos conocidos en la técnica, incluidos los descritos en la presente descripción. Por ejemplo, la unión a CD40 humano y la inhibición de la interacción CD40-CD40L se pueden evaluar mediante el uso de una línea celular que expresa CD40 humano a través de análisis FACS.

En un aspecto de la descripción, la actividad antagonista o agonista de CD40 de un anticuerpo anti-CD40 se determina mediante el uso de una línea celular reportera. Por ejemplo, las actividades antagonistas y agonistas pueden evaluarse mediante el uso de una línea celular reportera que expresa CD40 que expresa CD40 humano unido a fosfatasa alcalina (AP) mediado por NFkB. Cuando se recibe la señal a través de CD40, la activación de NFkB conduce a la secreción de AP que se mide mediante sustrato colorimétrico. Como un ensayo antagonista ilustrativo, se puede cultivar una línea reportera de CD40 con la línea celular Jurkat que expresa CD40L (para proporcionar la interacción fisiológica del ligando) o con CD40L soluble, donde se puede evaluar la capacidad del anticuerpo anti-CD40 para bloquear la señal de NFkB (poca a sin presencia de AP según se determina por los métodos estándar). Como un ensayo agonista ilustrativo, una línea celular reportera de CD40 humano se puede tratar con anticuerpos anti-CD40 y medirse la señal de NFkB (observada como la presencia de AP por encima del control negativo) como se describió anteriormente. Un ejemplo de una línea celular reportera de CD40 son las células HEK-Blue™ CD40L (InvivoGen), que sirven para medir la bioactividad de CD40L a través de la secreción de fosfatasa alcalina embrionaria (SEAP) tras la activación de NF-κB después de la estimulación de CD40. La interacción CD40L-CD40 se puede monitorear al evaluar los niveles de SEAP mediante el uso de QUANTI-Blue (InvivoGen).

En un aspecto, un anticuerpo antagonista anti-CD40, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la descripción tiene una IC50 de 0,4 nM o menos, según se determina mediante un ensayo reportero antagonista de CD40L soluble. En un aspecto, un anticuerpo antagonista anti-CD40, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la descripción tiene una IC50 de 51 nM o menos, según se determina mediante un ensayo reportero antagonista de CD40L en una línea celular Jurkat. En un aspecto, un anticuerpo antagonista anti-CD40, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la descripción tiene una IC50 de 3,4 nM o menos, según se determina mediante un ensayo reportero antagonista de CD40L en una línea celular Jurkat. En un aspecto, un anticuerpo antagonista anti-CD40, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la descripción tiene una IC50 de 0,9 nM o menos, según se determina mediante un ensayo reportero antagonista de CD40L en una línea celular Jurkat.

En un aspecto de la descripción, la actividad antagonista o agonista de CD40 de un anticuerpo anti-CD40 se determina mediante el uso de un ensayo agonista de células B. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo agonista de células B en el que las células B se activan con dosis bajas de anti-IgM e IL4, antes de la adición de un anticuerpo antagonista de CD40. La potenciación de la activación de las células B puede medirse como una regulación positiva de CD86, que a su vez es indicativo de actividad agonista. De manera similar, se puede utilizar un ensayo antagonista de células B en el que las células B humanas primarias se cultivan con una línea de células T humanas que expresa CD40L que conduce a la activación de las células B y la regulación positiva de la expresión de CD86 a través de la interacción CD40/CD40L. La inhibición de la regulación positiva de CD86 de las células B humanas primarias es indicativa de la actividad antagonista.

En un aspecto de la descripción, la actividad antagonista o agonista de CD40 de un anticuerpo anti-CD40 se determina mediante el uso de un ensayo mediado por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Las actividades antagonistas y agonistas se pueden evaluar por la capacidad del anticuerpo para mediar la ADCC. Un anticuerpo CD40 antagonista será un mediador efectivo de la ADCC, mientras que un anticuerpo agonista no tendrá actividad ADCC. La Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo (ADCC) se refiere a un tipo de citotoxicidad inducida por la activación de

macrófagos, células NK, células neutrófilas, etc., que reconocen las células diana al unirse a la región constante del anticuerpo a través de receptores Fc expresados en su superficie. La Citotoxicidad Dependiente del Complemento (CDC) se refiere a un tipo de citotoxicidad inducida por la activación de un sistema del complemento que ocurre mediante la unión de un anticuerpo a un antígeno. Una reducción en las actividades de ADCC y CDC significa una reducción en esas actividades en comparación con, por ejemplo, un anticuerpo antagonista control anti-CD40 tal como el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 4D11 (número de acceso FERM BP-7758). El documento EP1707627B1 describe ensayos para determinar la actividad ADCC y CDC.

Además, la actividad biológica de las células dendríticas (DC) estimuladas con Ab anti-CD40 inmovilizado puede usarse para evaluar la actividad agonista. Se cree que las DC son las células presentadoras de antígeno más potentes que son capaces de recoger Ags en tejidos no linfoides y transportarlos a órganos linfoides secundarios para cebar las células T en respuesta a estímulos de maduración tal como señales de peligro y auxiliaadoras. Por el contrario, la presentación de Ags por DC sin activación resulta en la eliminación de las células T efectoras que tienen un TCR afín o la inducción de células T reguladoras en los tejidos linfoides secundarios. Por lo tanto, la presencia o ausencia de señales de maduración para las DC inmaduras en tejidos periféricos actúa como un interruptor para inducir una respuesta inmune adaptativa o tolerancia. La principal señal auxiliadora de las células T CD4+ para la maduración de las DC se proporciona por la interacción entre CD40 expresado en las DC y el ligando de CD40 (L) en las células T CD4+ activadas. Por lo tanto, la estimulación de CD40 induce la migración de las DC a tejidos linfoides secundarios al regular de manera positiva la expresión de CCR7. Watanabe y otros 2003 J Immunol; 171: 5828-5836 describe ensayos que pueden usarse para determinar si los anticuerpos anti-CD40 pueden activar las DC para determinar la actividad agonista y antagonista. Tales ensayos ilustrativos incluyen la determinación de la expresión de Ag de MHC clase I/II y moléculas coestimuladoras en BM-DC estimuladas con Ab inmovilizado anti-CD40, actividad de migración *in vivo* de BM-DC estimuladas con Abs inmovilizados anti-CD40, actividad de migración *in vitro* y la expresión CCR7 de BM-DC estimuladas con Ab inmovilizado anti-CD40.

En un aspecto de la descripción, la actividad agonista de un anticuerpo anti-CD40, o porción de unión a antígeno del mismo, se determina mediante el uso de un ensayo de activación de monocitos *in vitro*, tal como el ensayo descrito a continuación en el Ejemplo 7. Un ensayo de activación de monocitos *in vitro* incluye exponer los monocitos a un anticuerpo anti-CD40, o porción de unión a antígeno del mismo, donde si el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, es un activador de CD40 (agonista), entonces hay un aumento resultante en la producción de TNF. Mediante el uso de un ensayo de activación de monocitos *in vitro*, un anticuerpo antagonista anti-CD40, o porción de unión a antígeno del mismo, que está sustancialmente libre de actividad agonista resultaría en la ausencia o producción mínima de TNF, como se describe en el Ejemplo 7.

En un aspecto de la descripción, un anticuerpo antagonista anti-CD40, o porción de unión a antígeno del mismo, que está sustancialmente libre de actividad agonista tiene actividad que está dentro de una desviación estándar de un control negativo en un ensayo agonista de CD40 *in vitro*, por ejemplo, el ensayo agonista de monocitos descrito en el Ejemplo 7.

Los ensayos agonistas se describen adicionalmente en los documentos US 5786456, US2011/0243932 y EP1707627B1. Los ensayos antagonistas para probar la función del anticuerpo se describen adicionalmente en los documentos US 7361345, US2011/0243932 y EP1707627B1.

En el aspecto preferido de la descripción, el anticuerpo aislado, o porción de unión al antígeno del mismo, se une a CD40 humano, en donde el anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, se disocia de CD40 humano con una constante de velocidad k_{off} de aproximadamente $0,1 \text{ s}^{-1}$ o menos, según se determina mediante resonancia de plasmones de superficie, o que inhibe la actividad de CD40 humano con una IC_{50} de aproximadamente $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, puede disociarse de CD40 humano con una constante de velocidad k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ o menos, según se determina mediante resonancia de plasmones de superficie, o puede inhibir la actividad de CD40 humano con un IC_{50} de aproximadamente $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, puede disociarse de CD40 humano una constante de velocidad k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o menos, según se determina mediante resonancia de plasmones de superficie, o puede inhibir CD40 humano con un IC_{50} de aproximadamente $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, puede disociarse de CD40 humano con una constante de velocidad k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menos, según se determina mediante resonancia de plasmones de superficie, o puede inhibir la actividad de CD40 con una IC_{50} de aproximadamente $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, puede disociarse de CD40 humano con una constante de velocidad k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o menos, según se determina mediante resonancia de plasmones de superficie, o puede inhibir CD40 con una IC_{50} de aproximadamente $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ o menos. Alternativamente, el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, puede disociarse del CD40 humano con una constante de velocidad k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o menos, según se determina mediante resonancia de plasmones de superficie, o puede inhibir la actividad de CD40 con una IC_{50} de aproximadamente $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ o menos.

Los anticuerpos se humanizaron como se describe en los Ejemplos a continuación. Las mutaciones restauradoras del marco se introdujeron en las secuencias de anticuerpos injertadas de CDR mediante *síntesis de novo* del dominio variable o mediante cebadores oligonucleotídicos mutagénicos y reacción en cadena de la polimerasa, o permitiendo ambas combinaciones diferentes de mutaciones restauradoras y otras mutaciones para cada uno de los injertos de CDR. Las

regiones variables humanizadas de los anticuerpos monoclonales murinos de CD40 se clonaron en vectores de expresión de IgG para la caracterización funcional.

En ciertos aspectos, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, tal como una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. Preferentemente, la región constante de la cadena pesada es una región constante de la cadena pesada de IgG1 o una región constante de la cadena pesada de IgG4. Además, el anticuerpo puede comprender una región constante de la cadena ligera, ya sea una región constante de la cadena ligera kappa o una región constante de la cadena ligera lambda. Preferentemente, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena ligera kappa. Alternativamente, la porción de anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fab o un fragmento Fv de cadena sencilla.

5. Generación de anticuerpos anti-CD40 humanizados

Como se describió anteriormente, los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especies no humanas que se unen al antígeno deseado que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las especies no humanas y regiones marco de una molécula de inmunoglobulina humana. Se describen secuencias de Ig humanas conocidas, *por ejemplo*, en www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/m-ikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immu-nology.html; www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/about.hcenter/index.html; www.bio-tech.ufl.edu/about.hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.ac.jp/about.yasuhito-/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/about.fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; aximtl.imt.uni-mar-burg.de/about.rek/AEP-Start.html; baserv.uci.kun.nl/about.jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/immu-no.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; im-gt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/about.honegger/AHOseminar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/caewg/caewg.htm; www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/humanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.bio-sci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/about.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/frroducts.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html. Kabat y otros, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983). Tales secuencias importadas se pueden usar para reducir la inmunogenicidad o reducir, potenciar o modificar la unión, la afinidad, la velocidad de asociación, la velocidad de disociación, la avidéz, la especificidad, la vida media o cualquier otra característica adecuada, como se conoce en la técnica.

Los residuos marco en las regiones marco humanas pueden sustituirse con el residuo correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones en el marco se identifican por métodos bien conocidos en la técnica, *por ejemplo*, modelando las interacciones de los residuos de la CDR y marco para identificar los residuos marco importantes para la unión al antígeno y la comparación de secuencias para identificar los residuos marco inusuales en posiciones particulares. (Véase, *por ejemplo*, Queen y otros, Patente de los Estados Unidos Núm. 5,585,089; Riechmann y otros, Nature 332: 323 (1988)). Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Se encuentran disponibles programas de computadora que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias consenso e importación de manera que se logre la característica del anticuerpo deseada, tal como una mayor afinidad por el antígeno o los antígenos diana. En general, los residuos de CDR están directamente y más sustancialmente involucrados en influir en la unión al antígeno. Los anticuerpos pueden humanizarse mediante el uso de una variedad de técnicas conocidas en la técnica, tales como, pero sin limitación, las descritas en Jones y otros, Nature 321: 522 (1986); Verhoeven y otros, Science 239: 1534 (1988)), Sims y otros, J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901 (1987), Carter y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 89: 4285 (1992); Presta y otros, J. Immunol. 151: 2623 (1993), Padlan, Molecular Immunology 28 (4/5): 489-498 (1991); Studnicka y otros, Protein Engineering 7 (6): 805-814 (1994); Roguska y otros, PNAS 91: 969-973 (1994); Publicación PCT WO 91/09967, PCT/: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, EP 592,106; EP 519.596, EP 239.400, las patentes de EE.UU. núms. 5,565,332, 5,723,323, 5,976,862, 5,824,514, 5,817,483, 5,814,476, 5,763,192, 5,723,323, 5,766,886, 5,714,352, 6,204,023, 6,180,370, 5,693,762, 5,530,101, 5,585,089, 5,225,539; 4,816,567.

Se proporcionan ejemplos de anticuerpos humanizados anti-CD40 en las Secciones 1 y 2 anteriores y en los Ejemplos a continuación.

II. Producción de anticuerpos y líneas celulares productoras de anticuerpos

Los anticuerpos de la presente invención pueden fabricarse mediante cualquiera de una serie de técnicas conocidas en la técnica.

1. Anticuerpos monoclonales anti-CD40 mediante el uso de la tecnología del hibridoma

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante el uso de una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen el uso tecnologías de hibridoma, recombinantes y de presentación en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir mediante el uso de técnicas de hibridoma, que incluyen las conocidas en la técnica y enseñadas, por ejemplo, en Harlow y otros, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^{da} edición 1988); Hammerling, y otros, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, NY, 1981). El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente descripción no se limita a anticuerpos producidos mediante la tecnología del hibridoma. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de un solo clon, que incluye cualquier clon eucariota, procariota o de fago, y no el método por el cual se produce.

Los métodos para producir y seleccionar anticuerpos específicos mediante el uso de la tecnología del hibridoma son rutinarios y bien conocidos en la técnica. En una modalidad, la presente invención proporciona métodos para generar anticuerpos monoclonales así como también anticuerpos producidos por el método que comprende cultivar una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo de la invención en donde, preferentemente, el hibridoma se genera fusionando esplenocitos aislados de un ratón inmunizado con un antígeno de la invención con células de mieloma y luego seleccionando los hibridomas resultantes de la fusión para clones de hibridoma que secretan un anticuerpo capaz de unirse a un polipéptido de la invención (véase el Ejemplo 1). Brevemente, los ratones pueden inmunizarse con un antígeno CD40. En una modalidad preferida, el antígeno CD40 se administra con un adyuvante para estimular la respuesta inmune. Tales adyuvantes incluyen adyuvante de Freund completo o incompleto, RIBI (dipéptidos de muramilo) o ISCOM (complejos inmunoestimulantes). Tales adyuvantes pueden proteger el polipéptido de la dispersión rápida al secuestrarlo en un depósito local, o pueden contener sustancias que estimulan al huésped a secretar factores quimiotácticos para los macrófagos y otros componentes del sistema inmune. Preferentemente, si se está administrando un polipéptido, el esquema de inmunización implicará dos o más administraciones del polipéptido, distribuidas durante varias semanas.

Después de la inmunización de un animal con un antígeno CD40, pueden obtenerse anticuerpos y/o células productoras de anticuerpos del animal. Se obtiene un suero que contiene el anticuerpo anti-CD40 del animal sangrando o sacrificando el animal. El suero se puede usar tal como se obtiene del animal, se puede obtener una fracción de inmunoglobulina del suero o los anticuerpos anti-CD40 se pueden purificar del suero. El suero o las inmunoglobulinas obtenidas de esta manera son policlonales, por lo que tienen una serie heterogénea de propiedades.

Una vez que se detecta una respuesta inmune, *por ejemplo*, se detectan anticuerpos específicos para el antígeno CD40 en el suero del ratón, se recoge el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan luego mediante técnicas bien conocidas a cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo, células de la línea celular SP20 disponibles de ATCC. Los hibridomas se seleccionan y clonan por dilución limitada. Los clones de hibridoma luego se analizan mediante métodos conocidos en la técnica para determinar células que secretan anticuerpos capaces de unirse a CD40. El líquido ascítico, que generalmente contiene altos niveles de anticuerpos, puede generarse inmunizando ratones con clones de hibridoma positivos.

Los hibridomas inmortalizados que producen anticuerpos pueden prepararse a partir del animal inmunizado. Después de la inmunización, el animal se sacrifica y las células B esplénicas se fusionan con células de mieloma inmortalizadas como es bien conocido en la técnica. Ver, *por ejemplo*, Harlow y Lane, *más arriba*. En una modalidad preferida, los anticuerpos de la invención se producen mediante el uso de células de mieloma que no secretan polipéptidos de inmunoglobulina (una línea celular no secretora). Después de la fusión y la selección con antibiótico, los hibridomas se criban mediante el uso de CD40, o una porción del mismo, o una célula que expresa CD40. En una modalidad preferida, el cribado inicial se realiza mediante el uso de un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA), preferentemente un ELISA. Se proporciona un ejemplo de cribado ELISA en el documento WO 00/37504.

Los hibridomas que producen anticuerpos anti-CD40 se seleccionan, se clonan y se criban adicionalmente en busca de características convenientes, que incluyen el crecimiento robusto del hibridoma, alta producción de anticuerpos y características convenientes de anticuerpos, como se discute más adelante. Los hibridomas se pueden cultivar y expandir *in vivo* en animales singénicos, en animales que carecen de un sistema inmune, *por ejemplo*, ratones desnudos, o en cultivo celular *in vitro*. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos de selección, clonación y expansión de hibridomas.

En una modalidad preferida, los hibridomas son hibridomas de ratón, como se describió anteriormente. En otra modalidad preferida, los hibridomas se producen en una especie no humana, no de ratón, tal como ratas, ovejas, cerdos, cabras, vacas o caballos. En otra modalidad, los hibridomas son hibridomas humanos, en los que un mieloma no secretor humano se fusiona con una célula humana que expresa un anticuerpo anti-CD40.

Los fragmentos de anticuerpos que reconocen epítomos específicos pueden generarse mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')₂ de la invención pueden producirse mediante escisión proteolítica de moléculas de

inmunoglobulina, mediante el uso de enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de la cadena ligera y el dominio CHI de la cadena pesada.

5 2. Anticuerpos monoclonales anti-CD40 mediante el uso de SLAM

En otro aspecto de la descripción, los anticuerpos recombinantes se generan a partir de linfocitos individuales aislados mediante el uso de un procedimiento denominado en la técnica como el método de anticuerpo linfocitario seleccionado (SLAM), como se describe en la Patente de Estados Unidos núm. 5,627,052, la Publicación PCT WO 92/02551 y Babcock, JS y otros (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 93: 7843-7848. En este método, las células individuales que secretan anticuerpos de interés, *por ejemplo*, linfocitos derivados de cualquiera de los animales inmunizados descritos en la Sección 1, se criban mediante el uso de un ensayo de placa hemolítica específica de antígeno, en donde el antígeno CD40, una subunidad de CD40, o un fragmento del mismo, se acopla a los glóbulos rojos de ovejas mediante el uso de un enlazador, tal como biotina, y se usa para identificar células individuales que secretan anticuerpos con especificidad para CD40. Después de la identificación de las células que secretan los anticuerpos de interés, los ADNc de la región variable de la cadena pesada y ligera se rescatan de las células mediante PCR de transcriptasa inversa y estas regiones variables se pueden expresar, en el contexto de regiones constantes de inmunoglobulina apropiadas (por ejemplo, regiones humanas constantes), en células huésped de mamífero, tales como células COS o CHO. Las células huésped transfectadas con las secuencias de inmunoglobulina amplificadas, derivadas de linfocitos seleccionados *in vivo*, pueden someterse a un análisis y selección adicionales *in vitro*, por ejemplo, haciendo un barrido de las células transfectadas para aislar las células que expresan anticuerpos contra CD40. Las secuencias de inmunoglobulina amplificadas pueden manipularse adicionalmente *in vitro*, tal como por métodos de maduración de la afinidad *in vitro* tales como los descritos en la publicación PCT WO 97/29131 y la publicación PCT WO 00/56772.

25 Anticuerpos monoclonales anti-CD40 mediante el uso de animales transgénicos

En otro aspecto de la descripción, los anticuerpos se producen al inmunizar un animal no humano que comprende parte o la totalidad del locus de inmunoglobulina humana con un antígeno CD40. En un aspecto preferido, el animal no humano es un ratón transgénico XENOMOUSE, una cepa de ratón modificada que comprende grandes fragmentos de los loci de inmunoglobulina humana y es deficiente en la producción de anticuerpos de ratón. *Ver, por ejemplo*, Green y otros Nature Genetics 7: 13-21 (1994) y las patentes de los Estados Unidos 5,916,771, 5,939,598, 5,985,615, 5,998,209, 6,075,181, 6,091,001, 6,114,598 y 6,130,364. Ver también los documentos WO 91/10741, publicado el 25 de julio de 1991, WO 94/02602, publicado el 3 de febrero de 1994, WO 96/34096 y WO 96/33735, ambos publicados el 31 de octubre de 1996, WO 98/16654, publicado el 23 de abril, 1998, WO 98/24893, publicado el 11 de junio de 1998, WO 98/50433, publicado el 12 de noviembre de 1998, WO 99/45031, publicado el 10 de septiembre de 1999, WO 99/53049, publicado el 21 de octubre de 1999, WO 00 09560, publicado el 24 de febrero de 2000 y WO 00/037504, publicado el 29 de junio de 2000. El ratón transgénico XENOMOUSE produce un repertorio humano como un adulto de anticuerpos completamente humanos y genera Mabs humanos específicos de antígeno. El ratón transgénico XENOMOUSE contiene aproximadamente el 80 % del repertorio de anticuerpos humanos mediante la introducción de fragmentos YAC con configuración de línea germinal de tamaño de megabase de los loci de la cadena pesada humana y de loci de la cadena ligera x. Ver Mendez y otros, Nature Genetics 15: 146-156 (1997), Green y Jakobovits J. Exp. Medicina. 188: 483-495 (1998).

45 4. Anticuerpos monoclonales anti-CD40 mediante el uso de bibliotecas de anticuerpos recombinantes

Los métodos *in vitro* también se pueden usar para preparar los anticuerpos de la invención, en donde se criba una biblioteca de anticuerpos para identificar un anticuerpo que tiene la especificidad de unión deseada. Los métodos para tal cribado de bibliotecas de anticuerpos recombinantes son bien conocidos en la técnica e incluyen métodos descritos en, por ejemplo, Ladner y otros Patente de Estados Unidos núm. 5,223,409; Kang y otros Publicación PCT núm. WO 92/18619; Dower y otros Publicación PCT Núm. WO 91/17271; Winter y otros Publicación PCT Núm. WO 92/20791; Markland y otros Publicación PCT Núm. WO 92/15679; Breitling y otros Publicación PCT Núm. WO 93/01288; McCafferty y otros Publicación PCT Núm. WO 92/01047; Garrard y otros Publicación PCT Núm. WO 92/09690; Fuchs y otros (1991) Bio/Technology 9: 1370-1372; Hay y otros (1992) Hum Antibod Hybridomas 3: 81-85; Huse y otros (1989) Science 246: 1275-1281; McCafferty y otros, Nature (1990) 348: 552-554; Griffiths y otros (1993) EMBO J 12: 725-734; Hawkins y otros (1992) J Mol Biol 226: 889-896; Clackson y otros (1991) Nature 352: 624-628; Gram y otros (1992) PNAS 89: 3576-3580; Garrard y otros (1991) Bio/Technology 9: 1373-1377; Hoogenboom y otros (1991) Nuc Acid Res 19: 4133-4137; y Barbas y otros (1991) PNAS 88: 7978-7982, publicación de solicitud de patente de EE.UU. 20030186374 y publicación PCT núm. WO 97/29131.

La biblioteca de anticuerpos recombinantes puede ser de un sujeto inmunizado con CD40, o una porción de CD40, tal como el dominio extracelular. Alternativamente, la biblioteca de anticuerpos recombinantes puede ser de un sujeto naive, *es decir*, uno que no ha sido inmunizado con CD40, tal como una biblioteca de anticuerpos humanos de un sujeto humano que no ha sido inmunizado con CD40 humano. Los anticuerpos de la invención se seleccionan mediante cribado de la biblioteca de anticuerpos recombinantes con el péptido que comprende CD40 humano para seleccionar de esa manera aquellos anticuerpos que reconocen CD40. Los métodos para llevar a cabo tal cribado y selección son bien conocidos en la técnica, tal como se describe en las referencias en el párrafo anterior. Para seleccionar los anticuerpos de la invención

que tienen afinidades de unión particulares para hCD40, tales como aquellos que se disocian de CD40 humano con una constante de velocidad k_{off} particular, se puede usar el método conocido en la técnica de resonancia de plasmones de superficie para seleccionar anticuerpos que tienen la constante de velocidad k_{off} deseada. Para seleccionar anticuerpos de la invención que tienen una actividad neutralizante particular para hCD40, tales como aquellos con un IC_{50} particular, se pueden usar métodos estándar conocidos en la técnica para evaluar la inhibición de la actividad de hCD40.

En un aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une a CD40 humano. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo neutralizante. En varios aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante o un anticuerpo monoclonal.

Los anticuerpos de la presente invención pueden generarse mediante el uso de diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en fagos, los dominios de anticuerpos funcionales se muestran en la superficie de partículas de fagos que llevan las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En particular, tal fago puede utilizarse para presentar dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o biblioteca combinatoria de anticuerpos (por ejemplo, humanos o murinos). Los fagos que expresan un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno de interés pueden seleccionarse o identificarse con antígeno, *por ejemplo*, mediante el uso del antígeno etiquetado o el antígeno unido o capturado a una superficie sólida o perla. Los fagos usados en estos métodos son típicamente fagos filamentosos que incluyen dominios de unión fd y M13 expresados a partir de fagos con Fab, Fv o dominios de anticuerpos Fv estabilizados con disulfuro fusionados de manera recombinante con el gen del fago III o la proteína del gen VIII. Los ejemplos de métodos de presentación en fagos que pueden usarse para preparar los anticuerpos de la presente invención incluyen los descritos en Brinkman y otros, J. Immunol. Methods 182: 41-50 (1995); Ames y otros, J. Immunol. Methods 184: 177-186 (1995); Kettleborough y otros, Eur. J. Immunol. 24: 952-958 (1994); Persic y otros, Gene 187 9-18 (1997); Burton y otros, Advances in Immunology 57: 191-280 (1994); Solicitud PCT núm. PCT/GB91/01134; Publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y las patentes de EE.UU. núms. 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 y 5,969,108.

Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección del fago, las regiones codificantes de anticuerpos del fago pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos que incluyen anticuerpos humanos o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresarse en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levaduras y bacterias, *por ejemplo*, como se describe en detalle a continuación. Por ejemplo, las técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ también se pueden emplear mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax y otros, BioTechniques 12 (6): 864-869 (1992); y Sawai y otros, AJRI34: 26-34 (1995); y Better y otros, Science 240: 1041-1043 (1988). Los ejemplos de técnicas que pueden usarse para producir Fvs de cadena sencilla y anticuerpos incluyen los descritos en la patente de EE.UU. 4,946,778 y 5,258,498; Huston y otros, Methods in Enzymology 203: 46-88 (1991); Shu y otros, PNAS 90: 7995-7999 (1993); y Skerra y otros, Science 240: 1038-1040 (1988).

Alternativo al cribado de bibliotecas de anticuerpos recombinantes mediante la presentación en fagos, se pueden aplicar otras metodologías conocidas en la técnica para el cribado de grandes bibliotecas combinatorias para la identificación de anticuerpos de especificidad dual de la descripción. Un tipo de sistema de expresión alternativo es uno en el que la biblioteca de anticuerpos recombinantes se expresa como fusiones de proteínas-ARN, como se describe en la publicación PCT núm. WO 98/31700 de Szostak y Roberts, y en Roberts, RW y Szostak, JW (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 94: 12297-12302. En este sistema, se crea una fusión covalente entre un ARNm y el péptido o proteína que se codifica por traducción *in vitro* de ARNm sintéticos que portan puromicina, un antibiótico aceptor de peptidilo, en su extremo 3'. Por lo tanto, un ARNm específico puede enriquecerse a partir de una mezcla compleja de ARNm (*por ejemplo*, una biblioteca combinatoria) basándose en las propiedades del péptido o proteína codificados, *por ejemplo*, anticuerpo o porción del mismo, tal como la unión del anticuerpo, o porción del mismo, al antígeno de doble especificidad. Las secuencias de ácido nucleico que codifican los anticuerpos, o porciones de los mismos, recuperados del cribado de tales bibliotecas pueden expresarse por medios recombinantes como se describió anteriormente (por ejemplo, en células huésped de mamífero) y, además, pueden someterse a una maduración de la afinidad adicional mediante rondas adicionales de cribado de fusiones de ARNm-péptido en las que se han introducido mutaciones en la(s) secuencia(s) seleccionada(s) originalmente, o por otros métodos para la maduración de la afinidad *in vitro* de anticuerpos recombinantes, como se describió anteriormente.

En otro enfoque, los anticuerpos de la presente invención también pueden generarse mediante el uso de métodos de presentación en levadura conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en levadura, los métodos genéticos se usan para unir los dominios de anticuerpos a la pared celular de la levadura y presentarlos en la superficie de la levadura. En particular, tal levadura se puede utilizar para presentar dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o una biblioteca combinatoria de anticuerpos (por ejemplo, humanos o murinos). Los ejemplos de métodos de presentación en levadura que pueden usarse para fabricar los anticuerpos de la presente invención incluyen los descritos en Wittrup y otros.

5. Producción de anticuerpos recombinantes CD40

Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse mediante cualquiera de una serie de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la expresión a partir de células huésped, en donde los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se transfectan en una célula huésped mediante técnicas estándar. Las diversas formas del término "transfección" pretenden abarcar una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, *por ejemplo*, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es posible expresar los anticuerpos de la invención en células huésped procariotas o eucariotas, es preferible la expresión de los anticuerpos en células eucariotas, y lo más preferible en células huésped de mamíferos, porque tales células eucariotas (y en particular las células de mamífero) son más probables que las células procariotas para ensamblar y secretar un anticuerpo correctamente plegado e inmunológicamente activo.

Las células huésped de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen las de ovario de hámster chino (células CHO) (incluidas las células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, usadas con un marcador seleccionable DHFR, *por ejemplo*, como se describe en RJ Kaufman y PA Sharp (1982) Mol. Biol. 159: 601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican los genes de anticuerpos se introducen en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, con mayor preferencia, la secreción del anticuerpo hacia el medio de cultivo en el que crecen las células huésped. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo mediante el uso de métodos estándar de purificación de proteínas.

Las células huésped también se pueden usar para producir fragmentos de anticuerpos funcionales, tal como fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entenderá que las variaciones en el procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, puede ser conveniente transfectar una célula huésped con ADN que codifique fragmentos funcionales de la cadena ligera y/o la cadena pesada de un anticuerpo de esta invención. La tecnología de ADN recombinante también se puede usar para eliminar parte o la totalidad del ADN que codifica una o ambas cadenas ligera y pesada que no es necesaria para la unión a los antígenos de interés. Las moléculas expresadas a partir de tales moléculas de ADN truncadas también están abarcadas por los anticuerpos de la invención. Además, se pueden producir anticuerpos bifuncionales en los que una cadena pesada y una cadena ligera son un anticuerpo de la invención y la otra cadena pesada y ligera son específicas para un antígeno distinto de los antígenos de interés mediante el entrecruzamiento de un anticuerpo de la invención con un segundo anticuerpo por métodos estándar de entrecruzamiento químico.

En un sistema preferido para la expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo se introduce en las células dhfr-CHO mediante transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de la cadena pesada y ligera del anticuerpo están cada uno operativamente unidos a elementos reguladores del promotor AdMLP/potenciador CMV para impulsar altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que se han transfectado con el vector mediante el uso de la selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera del medio de cultivo. Las técnicas estándar de biología molecular se usan para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar los transformantes, cultivar las células huésped y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Aún más, la invención proporciona un método para sintetizar un anticuerpo recombinante de la invención cultivando una célula huésped de la invención en un medio de cultivo adecuado hasta que se sintetiza un anticuerpo recombinante de la invención. El método puede comprender además aislar el anticuerpo recombinante del medio de cultivo.

Otro aspecto de la descripción proporciona un anticuerpo glicosilado, o una porción de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo comprende uno o más residuos de carbohidrato. La producción de proteínas nacientes *in vivo* puede experimentar un procesamiento adicional, conocido como modificación postraduccional. En particular, los residuos de azúcar (glicosilo) se pueden añadir enzimáticamente, un proceso conocido como glicosilación. Las proteínas resultantes que portan cadenas laterales de oligosacáridos unidos covalentemente se conocen como proteínas glicosiladas o glicoproteínas. Los anticuerpos son glicoproteínas con uno o más residuos de carbohidratos en el dominio Fc, así como también en el dominio variable. Los residuos de carbohidratos en el dominio Fc tienen un efecto importante sobre la función efectora del dominio Fc, con un efecto mínimo sobre la unión al antígeno o la vida media del anticuerpo (R. Jefferis, Biotechnol. Prog. 21 (2005), págs. 11-16). En contraste, la glicosilación del dominio variable puede tener un efecto sobre la actividad de unión a antígeno del anticuerpo. La glicosilación en el dominio variable puede tener un efecto negativo sobre la afinidad de unión del anticuerpo, probablemente debido a un impedimento estérico (Co, MS, y otros, Mol. Immunol. (1993) 30: 1361-1367), o resultar en una mayor afinidad por el antígeno (Wallick, SC, y otros, Exp. Med. (1988) 168: 1099-1109; Wright, A., y otros, EMBO J. (1991) 10: 2717-2723).

Un aspecto de la presente descripción se dirige a generar mutantes del sitio de glicosilación en los que el sitio de glicosilación O- o N- enlazado del anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, ha sido mutado. Un experto en la técnica puede generar tales mutantes mediante el uso de tecnologías estándar bien conocidas. Los mutantes del sitio de glicosilación que retienen la actividad biológica, pero tienen actividad de unión aumentada o disminuida, son otro objeto de la presente descripción.

En otro aspecto más, se modifica la glicosilación del anticuerpo o la porción de unión a antígeno de la descripción. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tales modificaciones de carbohidratos se pueden lograr mediante, por ejemplo, la alteración de uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia de anticuerpos. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos que resulten en la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de región variable para eliminar de esa manera la glicosilación en ese sitio. Tal glicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tal enfoque se describe con más detalle en la publicación PCT WO2003016466A2 y la patente de EE.UU. núms. 5,714,350 y 6,350,861.

Adicionalmente o alternativamente, se puede preparar un anticuerpo modificado de la descripción que tenga un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tiene estructuras aumentadas de GlcNAc bisectantes. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidratos se pueden lograr mediante, por ejemplo, la expresión del anticuerpo en una célula huésped con maquinaria de glicosilación alterada. Las células con maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y pueden usarse como células huésped en las que se expresan anticuerpos recombinantes de la invención para producir de esa manera un anticuerpo con glicosilación alterada. Ver, por ejemplo, Shields, RL y otros (2002) J. Biol. Chem 277: 26733-26740; Umana y otros (1999) Nat. Biotech. 17: 176-1, así como también, la Patente Europea Núm: EP 1,176,195; Publicaciones PCT WO 03/035835; WO 99/54342 80.

La glicosilación de proteínas depende de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, así como también de la célula huésped en la que se expresa la proteína. Diferentes organismos pueden producir diferentes enzimas de glicosilación (*por ejemplo*, glicosiltransferasas y glicosidasas), y tienen diferentes sustratos (azúcares de nucleótidos) disponibles. Debido a tales factores, el patrón de glicosilación de proteínas y la composición de los residuos de glicosilo pueden diferir en dependencia del sistema huésped en el que se expresa la proteína particular. Los residuos de glicosilo útiles en la invención pueden incluir, entre otros, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, n-acetilglucosamina y ácido siálico. Preferentemente, el anticuerpo glicosilado, o una porción de unión a antígeno del mismo, comprende residuos de glicosilo de manera que el patrón de glicosilación es humano.

Los expertos en la técnica saben que la glicosilación diferente de proteínas puede resultar en características diferentes de proteína. Por ejemplo, la eficacia de una proteína terapéutica producida en un huésped de microorganismo, tal como levadura, y glicosilada mediante el uso de la vía endógena de la levadura puede reducirse en comparación con la de la misma proteína expresada en una célula de mamífero, tal como una línea celular CHO. Tales glicoproteínas también pueden ser inmunogénicas en humanos y mostrar una vida media reducida *in vivo* después de la administración. Los receptores específicos en humanos y otros animales pueden reconocer residuos de glicosilo específicos y promover la eliminación rápida de la proteína del torrente sanguíneo. Otros efectos adversos pueden incluir cambios en el plegamiento de proteínas, solubilidad, susceptibilidad a las proteasas, tráfico, transporte, compartimentación, secreción, reconocimiento por otras proteínas o factores, antigenicidad o alergenicidad. En consecuencia, un profesional puede preferir una proteína terapéutica con una composición y patrón de glicosilación específicos, por ejemplo, composición y patrón de glicosilación idénticos, o al menos similares, a los producidos en células humanas o en las células específicas de la especie del animal en cuestión.

La expresión de proteínas glicosiladas diferentes de las de una célula huésped puede lograrse modificando genéticamente la célula huésped para expresar enzimas de glicosilación heterólogas. Mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica, un profesional puede generar anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos que exhiben glicosilación de proteínas humanas. Por ejemplo, las cepas de levadura se han modificado genéticamente para expresar enzimas de glicosilación que no se encuentran de manera natural, de manera que las proteínas glicosiladas (glicoproteínas) producidas en estas cepas de levadura exhiben glicosilación de proteínas idéntica a las de las células animales, especialmente células humanas (Publicaciones de patentes de EE.UU. núms. 20040018590 y 20020137134 y publicación PCT WO2005100584 A2).

Además de los anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, la presente descripción también se dirige a un anticuerpo antiidiotipo (anti-Id) específico para tales anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, de la descripción. Un anticuerpo anti-Id es un anticuerpo, que reconoce determinantes únicos generalmente asociados con la región de unión al antígeno de otro anticuerpo. El anti-Id se puede preparar inmunizando un animal con el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, o una región que contiene CDR del mismo. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotipos del anticuerpo inmunizante y producirá un anticuerpo anti-Id. El anticuerpo anti-Id también puede usarse como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmune en otro animal más, produciendo un denominado anticuerpo anti-anti-Id.

Además, un experto en la técnica apreciará que una proteína de interés puede expresarse mediante el uso de una biblioteca de células huésped genéticamente modificadas para expresar varias enzimas de glicosilación, de manera que las células huésped miembros de la biblioteca produzcan la proteína de interés con patrones de glicosilación variantes. Luego, un profesional puede seleccionar y aislar la proteína de interés con nuevos patrones particulares de glicosilación. Preferentemente, la proteína que tiene un patrón de glicosilación novedoso particularmente seleccionado exhibe propiedades biológicas mejoradas o alteradas.

III. Usos de anticuerpos antagonistas anti-CD40

Dada su capacidad para unirse al CD40 humano, los anticuerpos anti CD40 humanos, o partes de los mismos, de la descripción pueden usarse para detectar CD40 humano (por ejemplo, en una muestra biológica, tal como suero o plasma), mediante el uso de un inmunoensayo convencional, tales como ensayos de inmunosorción ligada a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica de tejidos. La descripción proporciona un método para detectar CD40 humano en una muestra biológica que comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la descripción y detectar el anticuerpo (o porción de anticuerpo) unido a CD40 humano o anticuerpo no unido (o porción de anticuerpo), para detectar de esa manera CD40 humano en la muestra biológica. El anticuerpo se marca directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Las sustancias detectables adecuadas incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina, fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y los ejemplos de material radioactivo adecuado incluyen ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , o ^{153}Sm .

Alternativo al marcado del anticuerpo, el CD40 humano se puede analizar en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo de competencia que utiliza estándares de rhCD40 marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-CD40 humano no marcado. En este ensayo, la muestra biológica, los patrones de rhCD40 marcados y el anticuerpo anti-CD40 humano se combinan y se determina la cantidad de estándar de rhCD40 marcado unido al anticuerpo no marcado. La cantidad de CD40 humano en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de estándar de rhCD40 marcado unido al anticuerpo anti-CD40. De manera similar, el CD40 humano también se puede evaluar en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo de competencia que utiliza estándares de rhCD40 marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-CD40 humano no marcado.

Los anticuerpos y las porciones de anticuerpo de la descripción son preferentemente capaces de neutralizar la actividad de CD40 humano tanto *in vitro* como *in vivo*. En consecuencia, tales anticuerpos y porciones de anticuerpos de la invención pueden usarse para inhibir la actividad de hCD40, *por ejemplo*, en un cultivo celular que contiene hCD40, en sujetos humanos o en otros mamíferos que tienen CD40 con los que un anticuerpo de la invención reacciona de manera cruzada. En un aspecto, la descripción proporciona un método para inhibir la actividad de hCD40 que comprende poner en contacto hCD40 con un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención de manera que se inhiba la actividad de hCD40. Por ejemplo, en un cultivo celular que contiene o se sospecha que contiene hCD40, se puede añadir un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención al medio de cultivo para inhibir la actividad de hCD40 en el cultivo.

También se describe en la presente descripción un método para reducir la actividad de hCD40 en un sujeto, ventajosamente de un sujeto que padece una enfermedad o trastorno en el que la actividad de CD40 es perjudicial. La descripción proporciona métodos para reducir la actividad de CD40 en un sujeto que padece tal enfermedad o trastorno, cuyo método comprende administrar al sujeto un anticuerpo o porción de anticuerpo de la descripción de manera que se reduzca la actividad de CD40 en el sujeto. Preferentemente, el CD40 es un CD40 humano, y el sujeto es un sujeto humano. Alternativamente, el sujeto puede ser un mamífero que expresa un CD40 al que un anticuerpo de la invención es capaz de unirse. Aún más, el sujeto puede ser un mamífero en el que se ha introducido CD40 (por ejemplo, mediante la administración de CD40 o mediante la expresión de un transgén de CD40). Un anticuerpo de la invención puede administrarse a un sujeto humano con fines terapéuticos. Además, un anticuerpo de la invención puede administrarse a un mamífero no humano que expresa un CD40 con el que el anticuerpo es capaz de unirse para fines veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Con respecto a esto último, tales modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, pruebas de dosificaciones y ciclos de tiempo de administración).

Como se usa en la presente descripción, el término "un trastorno en el que la actividad de CD40 es perjudicial" pretende incluir enfermedades y otros trastornos en los que se ha demostrado que la presencia de CD40 en un sujeto que padece el trastorno es o se sospecha que es responsable de la fisiopatología del trastorno o un factor que contribuye a un empeoramiento del trastorno. En consecuencia, un trastorno en el que la actividad de CD40 es perjudicial es un trastorno en el que se espera que la reducción de la actividad de CD40 alivie los síntomas y/o la progresión del trastorno. Tales trastornos pueden evidenciarse, por ejemplo, por un aumento en la concentración de CD40 en un fluido biológico de un sujeto que padece el trastorno (por ejemplo, un aumento en la concentración de CD40 en suero, plasma, líquido sinovial, etc. del sujeto), que puede detectarse, por ejemplo, mediante el uso de un anticuerpo anti-CD40 como se describió anteriormente. Los ejemplos no limitantes de trastornos que pueden tratarse con los anticuerpos de la invención, y las variantes de los mismos, o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, incluyen los trastornos discutidos en la sección a continuación perteneciente a las composiciones farmacéuticas de los anticuerpos de la invención. Por ejemplo, los trastornos adecuados incluyen, entre otros, lupus eritematoso sistémico (SLE), lupus discoide, nefritis lúpica, sarcoidosis, artritis juvenil, artritis reumatoide, artritis psoriásica, síndrome de Reiter, espondilitis anquilosante, artritis gotosa, rechazo de un órgano o trasplante de tejido, enfermedad de injerto contra huésped, esclerosis múltiple, síndrome de hiper IgE, poliartritis nodosa, cirrosis biliar primaria, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca (enteropatía gluten sensible), hepatitis autoinmune, anemia perniciosa, anemia hemolítica

- autoinmune, psoriasis, esclerodermia , miastenia gravis, púrpura trombocitopénica autoinmune, tiroiditis autoinmune, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad del complejo inmunitario, síndrome de disfunción inmune por fatiga crónica (CFIDS), polimiositis y dermatomiositis, crioglobulinemia, trombólisis, cardiomiopatía, pénfigo vulgar, fibrosis, pulmón, fibrosis cervical, fibrilar, fibrosis, pulmón, sarcoma, pulmón I y diabetes mellitus tipo II, hipersensibilidad de tipo retardado de tipo 1, 2, 3 y 4, alergia o trastornos alérgicos, asma, síndrome de Churg-Strauss (granulomatosis alérgica), dermatitis atópica, dermatitis de contacto alérgica e irritante, urticaria, alergia mediada por IgE, aterosclerosis, vasculitis, miopatías inflamatorias idiopáticas, enfermedad hemolítica, enfermedad de Alzheimer y polineuropatía desmielinizante y enfermedad crónica. En una modalidad particular, la enfermedad o trastorno es un trastorno inflamatorio crónico. En una modalidad particular, el trastorno en el que la actividad de CD40 es perjudicial es una enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), que incluye, pero no se limita a, enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa.
- También se describe en la presente descripción, el anticuerpo anti-CD40, o parte de unión a antígeno, de la descripción se usa para tratar un trastorno en el que la actividad de TNF α es perjudicial, que incluye, pero no se limita a, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, hidradenitis supurativa, artritis idiopática juvenil, artritis psoriásica, psoriasis, espondilitis anquilosante y enfermedad de Crohn. En un aspecto de la descripción, el trastorno en el que la actividad de TNF α es perjudicial es la uveítis.
- En un aspecto, un anticuerpo anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción, *por ejemplo* Ab102, se usa para tratar a un sujeto humano que tiene una enfermedad inflamatoria intestinal (IBD).
- En un aspecto, un anticuerpo anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción, *por ejemplo* Ab102, se usa para tratar la colitis ulcerosa.
- En un aspecto, un anticuerpo anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción, *por ejemplo* Ab102, se usa para tratar la enfermedad de Crohn.
- En un aspecto, un anticuerpo anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción, *por ejemplo* Ab102, se usa para tratar el lupus eritematoso sistémico (SLE).
- En un aspecto, un anticuerpo anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción, *por ejemplo* Ab102, se usa para tratar la sarcoidosis.
- En un aspecto, un anticuerpo anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción, *por ejemplo* Ab102, se usa para tratar a un sujeto humano que tiene artritis juvenil.
- En un aspecto, un anticuerpo anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción, *por ejemplo* Ab102, se usa para tratar la artritis reumatoide.
- En un aspecto, un anticuerpo anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción, *por ejemplo* Ab102, se usa para tratar la artritis psoriásica.
- En un aspecto, un anticuerpo anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción, *por ejemplo* Ab102, se usa para tratar a un sujeto humano que tiene espondilitis anquilosante.
- En un aspecto, un anticuerpo anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción, *por ejemplo* Ab102, se usa para tratar la hidradenitis supurativa.
- En un aspecto, un anticuerpo anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción, *por ejemplo* Ab102, se usa para tratar la uveítis.
- En un aspecto, un anticuerpo anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción, *por ejemplo* Ab102, se usa para tratar Sjogren's.
- En un aspecto, un anticuerpo anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción, *por ejemplo* Ab102, se usa para tratar la psoriasis.
- En un aspecto, un anticuerpo anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción, *por ejemplo* Ab102, se usa para tratar la dermatitis atópica.
- En un aspecto, un anticuerpo anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción, *por ejemplo* Ab102, se usa para tratar la esclerodermia.
- Los mAbs anti-CD40 de la presente invención tendrán el potencial de tratar tanto a pacientes biológicamente naive como a poblaciones de respuesta inadecuada anti-TNF debido al papel central de CD40 en respuestas inmunes innatas y adaptativas. La presente descripción proporciona un tratamiento capaz de inhibir la señalización de CD40 que suprime las vías moleculares tales como la producción de TNF e IL-23 y la expresión de moléculas de adhesión/coestimuladoras

que mantienen la inflamación crónica en el intestino. Según el perfil de expresión de los pacientes con Crohn tratados con anti-TNF, el tratamiento con anti-CD40 puede tener el potencial de extenderse más allá de la población que responde con anti-TNF para tratar un segmento más amplio de pacientes con Crohn. En ciertos aspectos, la descripción proporciona un método para tratar una subpoblación de pacientes con IBD que no responden a la terapia anti-TNF. Tales pacientes con IBD pueden tener la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa y no han respondido o han tenido una respuesta limitada al tratamiento con un inhibidor de TNF α , tal como, pero sin limitarse a, infliximab, adalimumab, certolizumab pegol o golimumab. Los anticuerpos antagonistas anti-CD40 descritos en la presente descripción pueden usarse para tratar un no respondedor a TNF que tiene la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa. En ciertos aspectos, la descripción incluye un método para tratar a un paciente tratado, por ejemplo, un paciente adulto, con enfermedad de Crohn de actividad moderada a severa que no responde al TNF.

Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, pueden usarse solos o en combinación para tratar tales enfermedades. Debe entenderse que los anticuerpos de la invención o la porción de unión a antígeno de los mismos se pueden usar solos o en combinación con un agente adicional, *por ejemplo*, un agente terapéutico, seleccionando dicho agente adicional por el experto en la técnica para el propósito pretendido. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en la técnica como útil para tratar la enfermedad o afección que está siendo tratada por el anticuerpo de la presente invención. El agente adicional también puede ser un agente que imparte un atributo beneficioso a la composición terapéutica, *por ejemplo*, un agente que afecta la viscosidad de la composición. Debe entenderse además que las combinaciones que se incluirán dentro de esta descripción son aquellas combinaciones útiles para su propósito pretendido. Los agentes establecidos a continuación son para fines ilustrativos y no están destinados a ser limitantes. Las combinaciones, que son parte de esta descripción, pueden ser los anticuerpos de la presente invención y al menos un agente adicional seleccionado de las listas a continuación. La combinación también puede incluir más de un agente adicional, *por ejemplo*, dos o tres agentes adicionales si la combinación es tal que la composición formada puede realizar su función prevista.

La terapia de combinación puede incluir uno o más antagonistas de CD40, *por ejemplo*, anticuerpos anti-CD40 o fragmentos de los mismos, formulados y/o coadministrados con uno o más agentes terapéuticos adicionales, *por ejemplo*, uno o más inhibidores de la citocina y del factor de crecimiento, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios (*por ejemplo*, agentes antiinflamatorios sistémicos), agentes antifibróticos, inhibidores metabólicos, inhibidores enzimáticos y/o agentes citotóxicos o citostáticos, inhibidores mitóticos, antibióticos antitumorales, agentes inmunomoduladores, vectores para terapia génica, agentes alquilantes, agentes antiangiogénicos, antimetabolitos, agentes que contienen boro, agentes quimioprotectores, hormonas, agentes antihormonas, corticosteroides, agentes terapéuticos fotoactivos, oligonucleótidos, agentes radionúclidos, inhibidores de topoisomerasa, inhibidores de tirosina quinasa o radiosensibilizadores, como se describe más adelante.

En un aspecto, un anticuerpo anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción, *por ejemplo* Ab102, se usa en combinación con un segundo agente para tratar una enfermedad inflamatoria intestinal (IBD). En ciertos aspectos, el segundo agente es mesalamina, balsalazida, azatioprina, 6-MP, metotrexato, infliximab, certolizumab, adalimumab, golimumab, natalizumab, vedolizumab, ustekinumab o combinaciones de los mismos.

En un aspecto, un anticuerpo anti-CD40, o una porción de unión al antígeno del mismo, de la descripción, *por ejemplo*, Ab102, se usa en combinación con un segundo agente para tratar SLE, donde el segundo agente es nitropasta/nitroglicerina, nifedipina, sildenafil, tadalifil, o combinaciones de los mismos.

En un aspecto, un anticuerpo anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción, *por ejemplo*, Ab102, se usa en combinación con un segundo agente para tratar SLE, donde el segundo agente es un corticosteroide, un productor de esteroides endógenos, un NSAID, un agente antiinflamatorio, un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (DMARD), un agente inmunosupresor, un anticoagulante o combinaciones de los mismos.

En un aspecto, un anticuerpo anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción, *por ejemplo* Ab102, se usa en combinación con un corticosteroide para tratar SLE. Los ejemplos de corticosteroides que pueden usarse incluyen prednisolona, metilprednisolona, prednisona o combinaciones de los mismos.

En un aspecto, un anticuerpo anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción, *por ejemplo* Ab102, se usa en combinación con un agente que afecta la producción de esteroides endógenos, *por ejemplo*, corticotropina (Acthar), para tratar SLE.

En un aspecto, un anticuerpo anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción, *por ejemplo* Ab102, se usa en combinación con una terapia tópica o inyectada para tratar SLE. Un ejemplo de tal terapia incluye, pero no se limita a, cortisona, hidrocortisona, crema de pimecrolimus, ungüento de tacrolimus, imiquimod o combinaciones de los mismos.

En un aspecto, un anticuerpo anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción, *por ejemplo* Ab102, se usa en combinación con un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID) para tratar SLE. Un ejemplo de un NSAID que puede usarse en una terapia de combinación incluye, pero no se limita a, indometacina, nabumetona, celecoxib, ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco o combinaciones de los mismos.

En un aspecto, un anticuerpo anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción, *por ejemplo*, Ab102, se usa en combinación con un medicamento antiinflamatorio para tratar SLE. En otros aspectos, el fármaco antiinflamatorio es paracetamol y/o salicilatos.

5 En un aspecto, un anticuerpo anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción, *por ejemplo*, Ab102, se usa en combinación con un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (DMARD) para tratar SLE. Un ejemplo de un DMARD incluye, pero no se limita a, hidroxicloroquina (Plaquenil), cloroquina, metotrexato (Rheumatrex), leflunomida (Arava), sulfasalazina o combinaciones de los mismos.

10 En un aspecto, un anticuerpo anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción, *por ejemplo* Ab102, se usa en combinación con Belimumab (Benlysta), Rituximab (Rituxan), Ig intravenosa, o combinaciones de los mismos.

15 En un aspecto, un anticuerpo anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción, *por ejemplo* Ab102, se usa en combinación con un agente inmunosupresor para tratar SLE. Los ejemplos de un agente inmunosupresor incluyen, pero no se limitan a, azatioprina (Imuran), ciclofosfamida (Cytosan), ciclosporina, tacrolimus y micofenolato.

20 En un aspecto, un anticuerpo anti-CD40, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción, *por ejemplo* Ab102, se usa en combinación con un agente anticoagulante para tratar SLE. Los ejemplos de un agente anticoagulante incluyen, pero no se limitan a, aspirina, heparina, warfarina y enoxaparina (Lovenox).

25 Otros ejemplos de agentes terapéuticos adicionales preferidos que pueden coadministrarse y/o formularse con uno o más antagonistas de CD40, *por ejemplo*, anticuerpos anti-CD40 o fragmentos de los mismos. Tales combinaciones pueden usarse para tratar trastornos relacionados con CD40 como se establece en la presente descripción. Los ejemplos adicionales de agentes terapéuticos que pueden coadministrarse y/o formularse con uno o más anticuerpos anti-CD40 o fragmentos de los mismos incluyen uno o más de: antagonistas de TNF (por ejemplo, un fragmento soluble de un receptor de TNF, *por ejemplo*, receptor de TNF humano p55 o p75 o derivados del mismo, *por ejemplo*, 75 kD TNFR-IgG (proteína de fusión de receptor de TNF-IgG de 75 kD, ENBREL)); antagonistas de la enzima TNF, *por ejemplo*, inhibidores de la enzima convertidora de TNF (TACE); antagonistas del receptor muscarínico; antagonistas de TGF-beta; interferón gamma; perfenidona; agentes quimioterapéuticos, *por ejemplo*, metotrexato, leflunomida o un sirolimus (rapamicina) o un análogo de los mismos, *por ejemplo*, CCI-779; inhibidores de COX2 y cPLA2; fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID); inmunomoduladores; inhibidores de p38, inhibidores de TPL-2, MK-2 y NFkB, entre otros.

35 Otras combinaciones preferidas son los fármacos antiinflamatorios supresores de citocinas (CSAID); anticuerpos contra o antagonistas de otras citocinas humanas o factores de crecimiento, por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, IL-21, IL-31, interferones, EMAP-II, GM-CSF, FGF, EGF, PDGF y endotelina-1, así como también los receptores de estas citocinas y factores de crecimiento. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, se pueden combinar con anticuerpos contra moléculas de la superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, CTLA o sus ligandos, incluido CD154 (gp39 o CD40L).

45 Las combinaciones preferidas de agentes terapéuticos pueden interferir en diferentes puntos de la cascada inflamatoria; los ejemplos preferidos incluyen antagonistas de TNF como anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos de TNF, adalimumab, (HUMIRA; D2E7; Publicación PCT núm. WO 97/29131), CA2 (REMICADE), CDP 571, y receptores de TNF p55 o p75 solubles, derivados de los mismos, (p75TNFR1gG (ENBREL) o p55TNFR1gG (LENERCEPT), y también inhibidores de la enzima convertidora de TNF (TACE); de manera similar, los inhibidores de IL-1 (inhibidores de la enzima convertidora de interleucina-1, IL-1RA, etc.) pueden ser efectivos por la misma razón. Otras combinaciones preferidas incluyen interleucina 4.

50 Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas en el tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación como se usa en la presente descripción se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos a tratar; cada unidad que contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La descripción para las formas de unidad de dosificación de la invención está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular que se va a lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la composición de tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

65 Cabe señalar que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la gravedad de la afección a aliviar. Debe entenderse además que para cualquier sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la

administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación establecidos en la presente descripción son sólo ilustrativos y no están destinados a limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada.

En otro aspecto, esta solicitud presenta un método para tratar (por ejemplo, curar, suprimir, mejorar, retrasar o prevenir la aparición o prevenir la recurrencia o recaída de) o prevenir un trastorno en el que la actividad de CD40 es perjudicial en un sujeto. El método incluye: administrar al sujeto un agente de unión a CD40 (particularmente un antagonista), *por ejemplo*, un anticuerpo anti-CD40 o un fragmento del mismo como se describe en la presente descripción, en una cantidad suficiente para tratar o prevenir el trastorno asociado a CD40. El antagonista de CD40, *por ejemplo*, el anticuerpo anti-CD40 o fragmento del mismo, puede administrarse al sujeto, solo o en combinación con otras modalidades terapéuticas como se describe en la presente descripción.

En otro aspecto, esta solicitud describe un método para detectar la presencia de CD40 en una muestra *in vitro* (por ejemplo, una muestra biológica, como suero, plasma, tejido, biopsia). El método específico puede usarse para diagnosticar un trastorno, *por ejemplo*, un trastorno inflamatorio. El método incluye: (i) poner en contacto la muestra o una muestra de control con el anticuerpo anti-CD40 o fragmento del mismo como se describe en la presente descripción; y (ii) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-CD40 o fragmento del mismo, y la muestra o la muestra de control, en donde un cambio estadísticamente significativo en la formación del complejo en la muestra con respecto a la muestra de control es indicativo de presencia de CD40 en la muestra.

En otro aspecto más, esta solicitud describe un método para detectar la presencia de CD40 *in vivo* (por ejemplo, imágenes *in vivo* en un sujeto). El método específico puede usarse para diagnosticar un trastorno, *por ejemplo*, un trastorno asociado a CD40. El método incluye: (i) administrar el anticuerpo anti-CD40 o fragmento del mismo como se describe en la presente descripción a un sujeto o un sujeto de control en condiciones que permitan la unión del anticuerpo o fragmento a CD40; y (ii) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo o fragmento y CD40, en donde un cambio estadísticamente significativo en la formación del complejo en el sujeto en relación con el sujeto de control es indicativo de la presencia de CD40.

Los reemplazos de residuos de aminoácidos en la porción Fc para alterar la función efectora del anticuerpo son conocidos en la técnica (Winter, y otros Patentes de los Estados Unidos Núms. 5,648,260; 5624821). La porción Fc de un anticuerpo media varias funciones efectoras importantes, por ejemplo, inducción de citocinas, ADCC, fagocitosis, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la vida media/velocidad de aclaramiento del anticuerpo y complejos antígeno-anticuerpo. En algunos casos, estas funciones efectoras son deseables para el anticuerpo terapéutico, pero en otros casos pueden ser innecesarias o incluso perjudiciales, en dependencia de los objetivos terapéuticos. Ciertos isotipos de IgG humana, particularmente IgG1 e IgG3, median ADCC y CDC a través de la unión a FcγR y C1q del complemento, respectivamente. Los receptores Fc neonatales (FcRn) son los componentes críticos que determinan la vida media circulante de los anticuerpos. En otra modalidad más, al menos un residuo de aminoácido se reemplaza en la región constante del anticuerpo, por ejemplo, la región Fc del anticuerpo, de manera que las funciones efectoras del anticuerpo se alteran.

Un aspecto proporciona un anticuerpo marcado, o una porción de unión a antígeno del mismo, en donde un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención se deriva o se une a una o más molécula(s) funcional(es) (por ejemplo, otro péptido o proteína). Por ejemplo, un anticuerpo marcado, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción se puede derivar uniendo funcionalmente un anticuerpo o porción de anticuerpo de la descripción (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente u otro) a una o más entidades moleculares, tal como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente farmacéutico, una proteína o péptido que puede mediar la asociación del anticuerpo o la porción de anticuerpo con otra molécula (tal como una región núcleo de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina), y/o un agente citotóxico o terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor mitótico, un antibiótico antitumoral, un agente inmunomodulador, un vector para terapia génica, un agente alquilante, un agente antiangiogénico, un antimetabolito, un agente que contiene boro, un agente quimioprotector, una hormona, un agente antihormona, un corticosteroide, un agente terapéutico fotoactivo, un oligonucleótido, un agente radionúclido, un inhibidor de topoisomerasa, un inhibidor de tirosina quinasa, un radiosensibilizador y una combinación de los mismos.

Los agentes detectables útiles con los que se puede derivar un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la descripción incluyen compuestos fluorescentes. Los ejemplos de agentes detectables fluorescentes incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina y similares. Un anticuerpo también puede derivarse con enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano, glucosa oxidasa y similares. Cuando un anticuerpo se deriva con una enzima detectable, se detecta mediante la adición de reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando está presente el agente detectable peroxidasa de rábano, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable. Un anticuerpo también puede derivarse con biotina y detectarse mediante la medición indirecta de la unión de avidina o estreptavidina.

Otro aspecto de la descripción proporciona un anticuerpo cristalizado, o una porción de unión a antígeno del mismo. Preferentemente, la descripción se refiere a cristales de anticuerpos anti-CD40 completos y fragmentos de los mismos como se describe en la presente descripción, y formulaciones y composiciones que comprenden tales cristales. En un

aspecto, el anticuerpo cristalizado, o una porción de unión a antígeno del mismo, tiene una vida media mayor *in vivo* que la contraparte soluble del anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo. En otro aspecto, el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, retiene la actividad biológica después de la cristalización.

- 5 El anticuerpo cristalizado, o una porción de unión a antígeno del mismo, de la descripción puede producirse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y como se describe en el documento WO 02072636.

IV. Composiciones Farmacéuticas

- 10 La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente efectiva" o una "cantidad profilácticamente efectiva" de un anticuerpo de la invención. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una
15 cantidad efectiva, a las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una persona experta en la técnica puede determinar una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o porción de anticuerpo y puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo para obtener una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva es también aquella en la que los efectos terapéuticamente beneficiosos
20 compensan los efectos tóxicos o perjudiciales del anticuerpo, o parte del anticuerpo. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, a las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

25 Las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos de la invención se usan, pero no se limitan a, diagnosticar, detectar o controlar un trastorno, para prevenir, tratar, controlar o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo, y/o en la investigación. En una modalidad específica, una composición comprende uno o más anticuerpos de la invención. También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más anticuerpos de la invención y uno o más
30 agentes profilácticos o terapéuticos distintos de los anticuerpos de la invención para tratar un trastorno en el que la actividad de CD40 es perjudicial. Preferentemente, los agentes profilácticos o terapéuticos que se sabe que son útiles o que se han usado o se usan actualmente en la prevención, tratamiento, manejo o mejora de un trastorno o uno o más síntomas del mismo. De acuerdo con estas modalidades, la composición puede comprender además un portador, diluyente o excipiente.

35 Los anticuerpos de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto. Típicamente, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en la presente descripción, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como también combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible
40 incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que mejoran la vida útil o la eficacia del anticuerpo o porción de anticuerpo.

Se conocen varios sistemas de suministro y se pueden usar para administrar uno o más anticuerpos de la invención o la combinación de uno o más anticuerpos de la invención y un agente profiláctico o agente terapéutico útil para prevenir,
50 controlar, tratar o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo, *por ejemplo*, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, endocitosis mediada por receptor (véase, *por ejemplo*, Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro, etc. Los métodos para administrar un agente profiláctico o terapéutico de la invención incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), administración epidural, administración intratumoral y administración mucosal (*por ejemplo*, vías intranasal y oral). Además, se puede emplear la administración pulmonar, *por ejemplo*, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente aerosolizante. Ver, *por ejemplo*, la patente de EE.UU. núms. 6,019,968, 5,985,320, 5,985,309, 5,934,272, 5,874,064, 5,855,913, 5,290,540, y 4,880,078; y las publicaciones PCT núms. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903. En un aspecto
60 de la descripción, se administra un anticuerpo de la invención, una terapia de combinación o una composición de la invención mediante el uso de la tecnología de suministro de fármaco pulmonar de Alkermes AIR (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.). En un aspecto específico, los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención se administran por vía intramuscular, intravenosa, intratumoral, oral, intranasal, pulmonar o subcutánea. Los agentes profilácticos o terapéuticos pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal,

etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

En un aspecto específico, puede ser deseable administrar los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención localmente en el área que necesita tratamiento; esto puede lograrse mediante, por ejemplo, y no a modo de limitación, infusión local, por inyección o por medio de un implante, dicho implante es de un material poroso o no poroso, incluidas membranas y matrices, tales como las membranas sialásticas, polímeros, matrices fibrosas (*por ejemplo*, TISSUEL) o matrices de colágeno. En un aspecto, una cantidad efectiva de uno o más anticuerpos de la invención antagonistas se administra localmente al área afectada a un sujeto para prevenir, tratar, manejar y/o mejorar un trastorno o un síntoma del mismo. En otro aspecto, una cantidad efectiva de uno o más anticuerpos de la invención se administra localmente al área afectada en combinación con una cantidad efectiva de una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) distintos de un anticuerpo de la invención de un sujeto para prevenir, tratar, manejar y/o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo.

En otro aspecto, el agente profiláctico o terapéutico de la invención puede suministrarse en un sistema de liberación controlada o de liberación sostenida. En un aspecto, se puede usar una bomba para lograr la liberación controlada o sostenida (ver Langer, *arriba*; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Ing. 14:20; Buchwald y otros, 1980, Surgery 88: 507; Saudek y otros, 1989, N. Engl. J. Med. 321: 574). En otro aspecto, los materiales poliméricos pueden usarse para lograr la liberación controlada o sostenida de las terapias de la invención (ver, *por ejemplo*, Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem 23:61; véanse también Levy y otros, 1985, Science 228: 190; During y otros, 1989, Ann. Neurol. 25: 351; Howard y otros, 1989, J. Neurosurg. 7 1: 105); Patente Núm. 5,679,377; Patente Núm. 5,916,597; Patente de EE.UU. Núm. 5,912,015; Patente Núm. 5,989,463; Patente Núm. 5,128,326; Publicación PCT Núm. WO 99/15154; y Publicación PCT Núm. WO 99/20253. Los ejemplos de polímeros usados en las formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli(metacrilato de 2-hidroxietil), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-vinil acetato), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicólidos) (PLGA) y poliortoésteres. En una modalidad preferida, el polímero usado en una formulación de liberación sostenida es inerte, libre de impurezas lixiviables, estable en almacenamiento, estéril y biodegradable. En otra modalidad más, se puede colocar un sistema de liberación controlada o sostenida cerca del objetivo profiláctico o terapéutico, requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica (véase, *por ejemplo*, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, *arriba*, vol. 2, págs. 115-138 (1984)).

Los sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión de Langer (1990, Science 249: 1527-1533). Cualquier técnica conocida por un experto en la técnica puede usarse para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la invención. Ver, *por ejemplo*, la patente de EE.UU. núm. 4,526,938, publicación PCT WO 91/05548, publicación PCT WO 96/20698, Ning y otros, 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel", Radiotherapy & Oncology 39: 179 -189, Song y otros, 1995, Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50: 372-397, Cleek y otros, 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24: 853-854, y Lam y otros, 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24: 759-760.

En un aspecto específico de la descripción, donde la composición de la descripción es un ácido nucleico que codifica un agente profiláctico o terapéutico, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para promover la expresión de su agente profiláctico o terapéutico codificado, al construirlo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de manera que se convierta en intracelular, *por ejemplo*, mediante el uso de un vector retroviral (véase la Patente de Estados Unidos núm. 4,980,286), o mediante inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes transfectantes, o administrándolo en enlace con un péptido similar a homeobox que se sabe que ingresa al núcleo (ver, *por ejemplo*, Joliot y otros, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1864-1868). Alternativamente, un ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula huésped para la expresión mediante recombinación homóloga.

Una composición farmacéutica de la invención está formulada para ser compatible con su ruta de administración prevista. Los ejemplos de rutas de administración incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral, *por ejemplo*, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, intranasal (por ejemplo, inhalación), transdérmica (por ejemplo, tópica), transmucosal y rectal. En una modalidad específica, la composición se formula de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral, intranasal o tópica a seres humanos. Típicamente, las composiciones para la administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

Si las composiciones de la invención se administran por vía tópica, las composiciones se pueden formular en forma de ungüento, crema, parche transdérmico, loción, gel, champú, nebulizador, aerosol, solución, emulsión u otra forma

conocida por un experto en la técnica. Véase, *por ejemplo*, Remington's Pharmaceutical Sciences e Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19^{na} ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). Para formas de dosificación tópica no pulverizables, se emplean típicamente formas viscosas a semisólidas o sólidas que comprenden un portador o uno o más excipientes compatibles con la aplicación tópica y que tienen una viscosidad dinámica preferentemente mayor que el agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, ungüentos, polvos, linimentos, pomadas y similares, que, si se desea, se esterilizan o mezclan con agentes auxiliares (por ejemplo, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, tampones, o sales) para influir en diversas propiedades, tal como, por ejemplo, la presión osmótica. Otras formas de dosificación tópica adecuadas incluyen preparaciones de aerosol pulverizables en donde el ingrediente activo, preferentemente en combinación con un portador inerte sólido o líquido, se envasa en una mezcla con un volátil presurizado (por ejemplo, un propelente gaseoso, tal como el freón) o en una botella de compresión. También se pueden añadir humectantes o hidratantes a las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación si se desea. Los ejemplos de tales ingredientes adicionales son bien conocidos en la técnica.

Si las composiciones de la invención se van a administrar por administración intranasal, la composición se puede formular en forma de aerosol, pulverización, neblina o en forma de gotas. En particular, los agentes profilácticos o terapéuticos para su uso de acuerdo con la presente descripción pueden suministrarse convenientemente en forma de una presentación en aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar al proporcionar una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos (compuestos, *por ejemplo*, de gelatina) para usar en un inhalador o insuflador pueden formularse con una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

Si las composiciones de la invención se van a administrar mediante administración oral, las composiciones se pueden formular por vía oral en forma de comprimidos, cápsulas, obleas, cápsulas de gel, soluciones, suspensiones y similares. Los comprimidos o cápsulas pueden prepararse por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); rellenos (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o fosfato de hidrógeno y calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); desintegrantes (por ejemplo, almidón de patata o almidón glicolato de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden tomar la forma, pero no se limitan a, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales de tampón, saborizantes, colorantes y agentes edulcorantes, según corresponda. Las preparaciones para la administración oral pueden formularse adecuadamente para liberación lenta, liberación controlada o liberación sostenida de un agente(s) profiláctico(s) o terapéutico(s).

El método de la descripción puede comprender la administración pulmonar, *por ejemplo*, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, de una composición formulada con un agente aerosolizante. Ver, *por ejemplo*, las patentes de EE.UU. núms. 6,019,968, 5,985,320, 5,985,309, 5,934,272, 5,874,064, 5,855,913, 5,290,540, y 4,880,078; y las publicaciones PCT núms. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903. En un aspecto específico, un anticuerpo de la invención, terapia de combinación y/o composición de la invención se administra mediante el uso de la tecnología de suministro de fármaco pulmonar de Alkermes AIR (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.).

El método de la descripción puede comprender la administración de una composición formulada para la administración parenteral mediante inyección (por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua). Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria (por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis) con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua libre de pirógenos estéril) antes de su uso.

Los métodos de la descripción pueden comprender adicionalmente la administración de composiciones formuladas como preparaciones de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (*por ejemplo*, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, las composiciones pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles (por ejemplo, como una sal escasamente soluble).

Los métodos de la descripción abarcan la administración de composiciones formuladas como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con aniones tales como los derivados de los ácidos

clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellos formados con cationes como los derivados del sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

Generalmente, los ingredientes de las composiciones se suministran por separado o se mezclan en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un recipiente herméticamente cerrado, como una ampolla o una bolsita que indica la cantidad de agente activo. Cuando el modo de administración es la infusión, la composición se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua o solución salina estéril de grado farmacéutico. Cuando el modo de administración es por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para la inyección o solución salina para que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

En particular, la invención también proporciona que uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención, estén envasadas en un recipiente herméticamente cerrado, tal como una ampolla o bolsita que indique la cantidad del agente. En una modalidad, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención se suministran como un polvo liofilizado esterilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado y pueden reconstituirse (por ejemplo, con agua o solución salina) para la concentración apropiada para la administración a un sujeto. Preferentemente, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas de la invención se suministran como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente herméticamente cerrado a una dosis unitaria de al menos 5 mg, con mayor preferencia al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 75 mg o al menos 100 mg. Los agentes profilácticos o terapéuticos liofilizados o las composiciones farmacéuticas de la invención deben almacenarse entre 2 °C y 8 °C en su recipiente original y los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención deben administrarse dentro de 1 semana, preferentemente dentro de los 5 días, dentro de las 72 horas, dentro de las 48 horas, dentro de las 24 horas, dentro de las 12 horas, dentro de las 6 horas, dentro de las 5 horas, dentro de las 3 horas, o dentro de 1 hora después de la reconstitución. En una modalidad alternativa, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas de la invención se suministran en forma líquida en un recipiente herméticamente sellado que indica la cantidad y concentración del agente. Preferentemente, la forma líquida de la composición administrada se suministra en un recipiente sellado herméticamente al menos 0,25 mg/ml, con mayor preferencia al menos 0,5 mg/ml, al menos 1 mg/ml, al menos 2,5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/ml, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml o al menos 100 mg/ml. La forma líquida debe almacenarse entre 2 °C y 8 °C en su recipiente original.

Los anticuerpos de la invención pueden incorporarse a una composición farmacéutica adecuada para la administración parenteral. Preferentemente, el anticuerpo se preparará como una solución inyectable que contiene 0,1-250 mg/ml de anticuerpo. La solución inyectable puede estar compuesta por una forma de dosificación líquida o liofilizada en un vial de sílex o ámbar, ampolla o jeringa precargada. El tampón puede ser L-histidina (1-50 mM), óptimamente 5-10 mM, a pH 5,0 a 7,0 (óptimamente pH 6,0). Otros tampones adecuados incluyen, pero no se limitan a, succinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio o fosfato de potasio. El cloruro de sodio se puede usar para modificar la toxicidad de la solución a una concentración de 0-300 mM (óptimamente 150 mM para una forma de dosificación líquida). Se pueden incluir crioprotectores para una forma de dosificación liofilizada, principalmente 0-10 % de sacarosa (óptimamente 0,5-1,0 %). Otros crioprotectores adecuados incluyen trehalosa y lactosa. Se pueden incluir agentes espesantes para una forma de dosificación liofilizada, principalmente 1-10 % de manitol (óptimamente 2-4 %). Los estabilizadores se pueden usar en formas de dosificación líquidas y liofilizadas, principalmente L-Metionina 1-50 mM (óptimamente 5-10 mM). Otros agentes espesantes adecuados incluyen glicina, arginina, se pueden incluir como 0-0,05 % de polisorbato-80 (óptimamente 0,005-0,01 %). Los tensioactivos adicionales incluyen, entre otros, polisorbato 20 y tensioactivos BRIJ. La composición farmacéutica que comprende los anticuerpos de la invención preparados como una solución inyectable para la administración parenteral, puede comprender además un agente útil como adyuvante, como los usados para aumentar la absorción o dispersión de una proteína terapéutica (por ejemplo, anticuerpo). Un adyuvante particularmente útil es la hialuronidasa, tal como HYLENEX (hialuronidasa humana recombinante). La adición de hialuronidasa en la solución inyectable mejora la biodisponibilidad humana después de la administración parenteral, particularmente la administración subcutánea. También permite mayores volúmenes en el sitio de inyección (es decir, más de 1 ml) con menos dolor e incomodidad, y una incidencia mínima de reacciones en el sitio de inyección. (ver WO2004078140, US2006104968).

En una modalidad, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención, *por ejemplo*, anticuerpo Ab102, histidina y un polisorbato, *por ejemplo*, polisorbato 80. En una modalidad, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende los aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y una cadena ligera que comprende los aminoácidos de SEQ ID NO: 40, histidina y un polisorbato, *por ejemplo*, polisorbato 80. En ciertas modalidades, la composición farmacéutica se liofiliza.

Las composiciones de esta invención pueden estar en una variedad de formas. Estos incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo de administración previsto y la aplicación terapéutica. Las composiciones preferidas típicas están en forma de soluciones inyectables o infusibles, tales como composiciones similares a las usadas para la inmunización pasiva de humanos con otros anticuerpos. El modo de administración preferido es parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una modalidad preferida, el anticuerpo se administra por infusión o inyección intravenosa. En otra modalidad preferida, el anticuerpo se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo (es decir, anticuerpo o porción de anticuerpo) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos liofilizados estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y el secado por pulverización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada estéril del mismo. La fluidez adecuada de una solución 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 la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo, en la composición, un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Los anticuerpos de la presente invención pueden administrarse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la ruta/modo de administración preferido es la inyección subcutánea, inyección intravenosa o infusión. Como apreciará el experto en la técnica, la ruta y/o el modo de administración variarán en dependencia de los resultados deseados. En ciertas modalidades, el compuesto activo puede prepararse con un portador que protegerá el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etileno y vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Ver, *por ejemplo*, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, JR Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

En ciertas modalidades, un anticuerpo de la invención puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) también pueden incluirse en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, comprimirse en comprimidos o incorporarse directamente a la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica oral, los compuestos pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, grageas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Para administrar un compuesto de la invención mediante otra administración que no sea parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para evitar su inactivación.

En otras modalidades, un anticuerpo de la invención puede conjugarse con una especie basada en polímero de manera que dicha especie basada en polímero pueda conferir un tamaño suficiente a dicho anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención de manera que dicho anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención se beneficie del efecto mejorado de permeabilidad y retención (efecto EPR) (véase también la publicación PCT núm. WO2006/042146A2 y las publicaciones estadounidenses núms. 2004/0028687A1, 2009/0285757A1 y 2011/0217363A1, y la patente de EE.UU. núm. 7,695,719).

Los compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones. En ciertas modalidades, un anticuerpo de la invención se formula y/o administra conjuntamente con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para tratar trastornos en los que la actividad de CD40 es perjudicial. Por ejemplo, un anticuerpo anti-hCD40 o una porción de anticuerpo de la invención puede formularse y/o coadministrarse con uno o más anticuerpos adicionales que se unen a otras dianas (por ejemplo, anticuerpos que se unen a las citocinas o que se unen a las moléculas de la superficie celular). Además, uno o más anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos anteriores. Tales terapias combinadas pueden utilizar ventajosamente dosificaciones más bajas de los agentes terapéuticos administrados, evitando así posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

En ciertas modalidades, un anticuerpo contra CD40 se une a un vehículo conocido en la técnica que extiende la vida media. Tales vehículos incluyen, pero no se limitan a, el dominio Fc, polietilenglicol y dextrano. Tales vehículos se describen, *por ejemplo*, en la Solicitud de Estados Unidos núm. de serie 09/428,082 y en la Solicitud PCT publicada núm. WO 99/25044.

Se describe en la presente descripción, las secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican un anticuerpo de la invención u otro agente profiláctico o terapéutico se administran para tratar, prevenir, manejar o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo mediante terapia génica. La terapia génica se refiere a la terapia realizada por la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En este aspecto de la descripción, los ácidos nucleicos producen su anticuerpo codificado o agente profiláctico o terapéutico que media un efecto profiláctico o terapéutico.

Cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la técnica puede usarse de acuerdo con la presente descripción. Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, ver Goldspiel y otros, 1993, Clinical Pharmacy 12: 488-505; Wu y Wu, 1991, Bioterapia 3: 87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596; Mulligan, Science 260: 926932 (1993); y Morgan y Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217; Mayo de 1993, TIBTECH 11

(5): 155-215. Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que se pueden usar se describen en Ausubel y otros (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990). Se proporciona una descripción detallada de varios métodos de terapia génica en el documento US20050042664 A1.

Será evidente para los expertos en la técnica que otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de los métodos de la invención descritos en la presente descripción son obvias y pueden hacerse mediante el uso de equivalentes adecuados sin apartarse del alcance de la invención o de las modalidades descritas en la presente descripción. Habiendo descrito ahora la presente invención en detalle, la misma se entenderá más claramente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen solo con fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Anticuerpos monoclonales antagonistas anti-CD40 humano (hCD40)

Para identificar anticuerpos antagonistas específicos de CD40, se usó la tecnología del hibridoma para aislar anticuerpos monoclonales murinos anti-CD40.

Brevemente, los ratones se inmunizaron con antígeno CD40 humano y adyuvante. Después de la inmunización, que incluyó varias administraciones del antígeno durante varias semanas, se colectó el suero de cada animal inmunizado. Luego se probó el suero mediante el uso de ELISA estándar y ensayos de citometría de flujo para identificar el suero que tenía anticuerpos capaces de detectar CD40. Una vez que se detectó la presencia de anticuerpos específicos para CD40 en el suero de ratón en base a los ensayos de unión, se colectó el bazo de ratón y se aislaron células productoras de anticuerpos de acuerdo con técnicas estándar. Los esplenocitos se fusionaron luego mediante técnicas conocidas para formar células de mieloma productoras de anticuerpos. Después de la fusión, se cribaron los hibridomas mediante ELISA y citometría de flujo para determinar las diversas características de bloqueo y neutralización del anticuerpo contra CD40.

Después del cribado, mientras que la mayoría de los anticuerpos se identificaron como que tenían actividad agonista, tres de los anticuerpos monoclonales murinos (Ab1, Ab2 y Ab3) se identificaron como que tenían actividad antagonista para CD40 sin actividad agonista sustancial. Las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera de estos tres anticuerpos murinos se describen a continuación en las Tablas 7 a 9. Las CDR dentro de las cadenas variable pesada (VH) y variable ligera (VL) se muestran en negrita (CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente).

TABLA 7: secuencias de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo murino 1 (Ab1)

SEQ ID NO.	Nombre del clon	Región del Anticuerpo	Descripción del residuo	Secuencia de aminoácidos
5	Ab1	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLKVS CAAS GFTFS D YGMNWVRQAPEKGLEWIA Y ISSGRS NIYYAD TVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDTAM YYCARS SWG YFDVWGTGTTVTVSS
6	Ab1	CDR-H1	Residuos 26-35 de SEQ ID NO.:5	GFTFS DYGMN
7	Ab1	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:5	Y ISSGRS NIYYADTVKG
8	Ab1	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO.:5	SWG YFDV
9	Ab1	VL		DIVMTQSPSSLTVTAGEMVTMSCKSSQSLLN SGNQKNYLTWFQQKPGQPPKLLIYWASTRES GVPDRFAGSGSGTDFLTITSSVQAEDLAVYY CQNDYTYPLTFGAGTKLEIK

10	Ab1	CDR-L1	Residues 24-40 of SEQ ID NO.:9	KSSQSLN SGNQKNYLT
11	Ab1	CDR-L2	Residuos 56-62 de SEQ ID NO.:9	WASTRES
12	Ab1	CDR-L3	Residuos 95-103 de SEQ ID NO.:9	QNDYTYPLT

TABLA 8: secuencias de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo murino 3 (Ab3)

SEQ ID NO.	Nombre del clon	Región del Anticuerpo	Descripción del residuo	Secuencia de aminoácidos
44	Ab3	VH		QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKAFGYTFTS YTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSSDYPNYNQ KFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAV YYCAR WGYSFDY WGQGTTTLTVSS
45	Ab3	CDR-H1	Residuos 26-35 de SEQ ID NO.:44	GYTFTSYTMH
46	Ab3	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:44	YINPSSDYPNYNQKFKD
47	Ab3	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO.:44	WGYSFDY
48	Ab3	VL		DIVMTQAAPSVSVIPGESVSISCRSSKSLH SNGNTYLYWFLQRPGQSPQYLIYRMSTLASG VPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYC MQHLEYPLT FGAGTKLELK
49	Ab3	CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO.:48	RSSKSLH SNGNTYLY
50	Ab3	CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO.:48	RMSTLAS
51	Ab3	CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO.:48	MQHLEYPLT

TABLA 9: secuencias de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo murino 2 (Ab2)

SEQ ID NO.	Nombre del clon	Región del Anticuerpo	Descripción del residuo	Secuencia de aminoácidos
75	Ab2	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLKVSCAASGFTFSD YGMNWRQ SPEK GLEW IA YISSGR GNIIYAD TVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSED TAMYYCAR SWGYFD WGTGTTVTVSS

6	Ab2	CDR-H1	Residuos 26-35 de SEQ ID NO.:75	GFTFSDYGMN
42	Ab2	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:75	YISSGRGNIYYADTVKG
8	Ab2	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO.:75	SWGYFDV
76	Ab2	VL		DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLN SGNQKNYLTWFQQKPGQPPKLLIYWASTRES GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYY CQNDYTYPLTFGAGTKLELK
10	Ab2	CDR-L1	Residuos 24-40 de SEQ ID NO.:76	KSSQSLLNSGNQKNYLT
11	Ab2	CDR-L2	Residuos 56-62 de SEQ ID NO.:76	WASTRES
12	Ab2	CDR-L3	Residuos 95-103 de SEQ ID NO.:76	QNDYTYPLT

Se identificaron secuencias consenso de las regiones CDR de los tres anticuerpos monoclonales murinos antagonistas anti-CD40 (Ab1, Ab2 y Ab3) y se proporcionan anteriormente en la Tabla 5. Las alineaciones de las secuencias de aminoácidos de la región variable de los tres anticuerpos murinos también se proporcionan en la Figura 4A (cadena ligera) y 4B (cadena pesada).

Las regiones variables de la cadena ligera y pesada murina (VH y VL) de los tres anticuerpos se clonaron mediante el uso de transcriptasa-PCR inversa (RT-PCR). Estas regiones VH y VL (descritas anteriormente en las Tablas 7 a 9) se clonaron posteriormente en vectores que comprenden regiones constantes de inmunoglobulina humana (Ig), y luego se expresaron en células huésped de mamífero como anticuerpos quiméricos. Estos anticuerpos quiméricos humanos (regiones humanas constantes y variables murinas) se caracterizaron luego mediante el uso de ensayos *in vitro* para determinar si cada uno tenía un efecto antagonista y/o agonista.

El análisis FACS se usó para determinar si los tres anticuerpos quiméricos anti-CD40 podrían unirse a huCD40 o CD40 cyno expresados en células de riñón embrionario humano (HEK). Si bien cada uno de los tres anticuerpos quiméricos podría unirse al CD40 humano expresado en las células HEK, solo dos de los anticuerpos quiméricos reconocieron el Anticuerpo cyno-quimérico 3 (chAb3) no se unió al CD40 cyno. Los resultados del estudio de unión FACS se resumen en la Tabla 10.

El análisis FACS también se usó para determinar si los tres anticuerpos quiméricos podrían inhibir la unión del ligando CD40 soluble (sCD40L) a CD40. Mediante el uso de células HEK que expresan CD40, se midieron los valores de IC50. Como se describe en la Tabla 10, cada uno de los anticuerpos quiméricos pudo bloquear la unión de CD40 a su ligando.

Además de los ensayos de unión, las actividades antagonistas y agonistas se midieron mediante el uso de una línea celular reportera que expresa CD40 que expresa CD40 humano unido a fosfatasa alcalina (AP) mediada por NFkB. En el ensayo de línea celular reportera que expresa CD40, cuando se recibe la señal a través de CD40, la activación de NFkB conduce a la secreción de AP que se mide por sustrato colorimétrico. Para determinar la actividad antagonista, la línea celular reportera de CD40 (HEK) se cultivó con la línea celular Jurkat que expresa CD40L (para proporcionar interacción fisiológica del ligando) o con CD40L soluble (por ejemplo, His-CD40L mencionado en la Tabla 10). Se midió la capacidad de los anticuerpos anti-CD40 para bloquear la señal de NFkB. Para medir la actividad agonista, la línea celular reportera de CD40 humana se trató directamente con los anticuerpos anti-CD40 y se midió la señal de NFkB. Los datos representativos del ensayo antagonista y agonista de CD40 para los tres anticuerpos quiméricos se resumen en la Tabla 10 y las Figuras 1A y 1B.

TABLA 10: Resumen de las características funcionales de los anticuerpos quiméricos anti-CD40

	Anticuerpos quiméricos CD40 (hCg1-LALA)	Unión por FACS a huCD40 HEK	Unión por FACS a cyCD40 HEK	Bloqueo por FACS de CD40 HEK IC50 nM	Agonista: ensayo reportero de huCD40 HEK	Antagonista: ensayo reportero de His-CD40L IC50 nM	Antagonista: Ensayo reportero/Jurkat IC50 nM
5							
10	Ab1 quimérico (chAb1)	Sí	Sí	2,3	No	0,4	51
	Ab3 quimérico (chAb3)	Sí	No	1,4	No	0,2	0,9
15	Ab2 quimérico (chAb2)	Sí	Sí	1,4	No	0,3	3,4

20 Como se describe en la Tabla 10 y la Figura 1, los anticuerpos quiméricos anti-CD40 mostraron actividad antagonista sin actividad agonista detectable. En base a los resultados de los experimentos anteriores, las regiones variables de la cadena pesada y ligera de los anticuerpos antagonistas anti-CD40 Ab1 y Ab3 se seleccionaron para la humanización.

25 Ejemplo 2: Humanización de los anticuerpos antagonistas anti-CD40 Ab1 y Ab3

Humanización del anticuerpo antagonista anti-CD40 Ab1

Los anticuerpos humanizados se generaron en base a las secuencias CDR pesadas variables (VH) y variables ligeras (VL) de Ab1. Específicamente, las secuencias de la línea germinal humana se seleccionaron para construir anticuerpos Ab1 humanizados injertados con CDR, donde los dominios CDR de las cadenas VH y VL de Ab1 se injertaron con diferentes secuencias aceptoras de cadenas pesadas y ligeras humanas. Sobre la base de los alineamientos con las secuencias de VH y VL del anticuerpo monoclonal Ab1, se seleccionaron las siguientes secuencias humanas como aceptoras:

1. IGHV3-21*01 e IGHJ6*01 para construir las secuencias aceptoras de la cadena pesada
- 35 2. IGHV3-48*01 e IGHJ6*01 como una aceptora alternativa para construir la cadena pesada
3. IGKV4-1*01 e IGKJ2*01 para construir secuencias aceptoras de la cadena ligera
4. IGKV2-40*01 e IGKJ2*01 como una aceptora alternativa para construir la cadena ligera

40 Los anticuerpos injertados con CDR se prepararon injertando las correspondientes CDR VH y VL de Ab1 en las secuencias aceptoras descritas en 1-4 anteriormente.

Para generar un anticuerpo humanizado con mutación(ones) restauradora(s) del marco, se identificaron e introdujeron mutaciones del marco en los anticuerpos injertados con CDR. Estas mutaciones se introdujeron mediante el uso de técnicas estándar, incluida la síntesis *de novo* del dominio variable con la(s) mutación(ones) restauradora(s) y cebadores oligonucleotídicos mutagénicos en reacciones en cadena de la polimerasa. Se construyeron diferentes combinaciones de mutaciones restauradoras y otras mutaciones para cada uno de los anticuerpos injertados con CDR (que contienen las CDR del anticuerpo Ab1) de la siguiente manera. (Nota: Los números de los residuos para las mutaciones mencionadas a continuación se basan en el sistema de numeración de Kabat).

50 Para las cadenas pesadas de los anticuerpos injertados con CDR, uno o más de los siguientes residuos de interfaz de Vernier y VH/VL se mutaron de manera restauradora: V48I y/o S49A.

Para las cadenas ligeras de los anticuerpos injertados con CDR, el siguiente residuo de interfaz de Vernier y VH/VL se mutó de manera restauradora: Y36F.

55 A continuación se proporcionan descripciones de las regiones variables de los anticuerpos humanizados derivados de Ab1 monoclonal murino:

- Ab1 humanizado (huAb1VH.1) es una VH Ab1 injertada con CDR que contiene las secuencias marco IGHV3-21*01 e IGHJ6*01;
- 60 • Ab1VH.1a humanizado (huAb1VH.1A) es una cadena pesada humanizada que comprende las secuencias de aminoácidos de huAb1VH.1 con las siguientes dos mutaciones restauradoras en el marco: V48I, S49A;
- Ab1VL.1 humanizado (huAb1VL.1) es una VL Ab1 injertada con CDR que contiene las secuencias marco IGKV4-1*01 e IGKJ2*01; y
- Ab1VL.1a humanizado (huAb1VL.1A) es una cadena ligera humanizada basada en huAb1VL.1 y contiene 1 mutación restauradora en el marco propuesto: Y36F.

Nota: IGHV3-21_IGHJ6 se refiere a un anticuerpo que comprende las secuencias variables correspondientes a IGHV3-21*01 e IGHJ6*01.

Las regiones variables humanizadas se clonaron después en vectores de expresión de IgG para la caracterización funcional de cuatro anticuerpos humanizados diferentes basados en las siguientes combinaciones de región variable de la cadena pesada y ligera:

- A. huAb1VH.1/VL.1
- B. huAb1VH.1A/VL.1
- C. huAb1VH.1/VL.1A
- D. huAb1VH.1A/VL.1A

Las secuencias de aminoácidos de la región variable y de CDR de los anticuerpos humanizados anteriores se describen en la Tabla 11 a continuación.

TABLA 11: secuencias de VH y VL de las versiones humanizadas del anticuerpo 1 (huAb1)

SEQ ID NO:	Clon	Región del Anticuerpo	Residuos	Secuencia de aminoácidos
13	huAb1VH.1/VL.1 VH	VH		EVQLVESGGGLV K PGGSLRLSCAAS GFTFS DYGMN WVRQAPGKGLEWVSY ISSGRSNIYY ADTVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARS SWGYFDV WGQGTTVTVSS
6	huAb1VH.1/VL. 1	CDR-H1	Residuos 26-35 de SEQ ID NO.: 13	GFTFS DYGMN
7	huAb1VH.1/VL. 1	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.: 13	YISSGRSNIYYADTVKG
8	huAb1VH.1/VL. 1	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO.: 13	SWGYFDV
14	huAb1VH.1/VL.1 V L	VL	14	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CKSSQSLL NSGNQKNYLT WYQQKPGQPPKLLIY WASTR ESGVPDR FSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVA VYYC QNDYTYPLT FGQGTKLEIK
10	huAb1VH.1/VL. 1	CDR-L1	Residuos 24-40 de SEQ ID NO.: 14	KSSQSLLNSGNQKNYLT
11	huAb1VH.1/VL. 1	CDR-L2	Residuos 56-62 de SEQ ID NO.: 14	WASTRES
12	huAb1VH.1/VL. 1	CDR-L3	Residuos 95-103 de SEQ ID NO.:14	QNDYTYPLT

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

15	huAb1VH.1A/VL.1	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFS DYGMN WVRQAPGKGLEWIA YISSGRSNIYY ADTVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAR SWG YFDV WGQGTTTVTVSS
6	huAb1VH. 1A/VL.1	CDR-H1	Residuos 26-35 de SEQ ID NO.:15	GFTFS DYGMN
7	huAb15VH. 1A/VL.1	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:15	YISSGRSNIYYADTVKG
8	huAb1VH.1A/VL.1	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO.:15	SWG YFDV
14	huAb1VH. 1A/VL.1	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CSSQSLL NSGNQKNYLT WYQQKPGQPPKLLIYWASTR ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVA VYYC QNDYTYPLT FGGQGTKLEIK
10	huAb1VH. 1A/VL.1	CDR-L1	Residuos 24-40 de SEQ ID NO.:14	CSSQSLLNSGNQKNYLT
11	huAb1VH. 1A/VL.1	CDR-L2	Residuos 56-62 de SEQ ID NO.:14	WASTRES
12	huAb1VH. 1A/VL.1	CDR-L3	Residuos 95-103 de SEQ ID NO.:14	QNDYTYPLT
13	huAb1VH.1/VL.1A VH	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFS DYGMN WVRQAPGKGLEWV SYISSGRSNIYY ADTVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAR SWG YFDV WGQGTTTVTVSS
6	huAb1VH.1/VL. 1A	CDR-H1	Residuos 26-35 de SEQ ID NO.:13	GFTFS DYGMN
7	huAb1VH.1/VL. 1A	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:13	YISSGRSNIYYADTVKG
8	huAb1VH.1/VL. 1A	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO.:13	SWG YFDV

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

16	huAb1VH.1/VL.1A VL	VL		DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCK KSSQSLL NSGNQKNYLT WFQQKPGQPPKLLIY WASTR ESGVPDRFSGSGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYC QNDYTYPLT FGGQGTKLEIK
10	huAb1VH.1/VL. 1A	CDR-L1	Residuos 24-40 de SEQ ID NO.:16	KSSQSLLNSGNQKNYLT
11	huAb1VH.1/VL. 1A	CDR-L2	Residuos 56-62 de SEQ ID NO.:16	WASTRES
12	huAb1VH.1/VL. 1A	CDR-L3	Residuos 95-103 de SEQ ID NO.:16	QNDYTYPLT
15	huAb1VH.1A/VL. 1A VH	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFS DYGMN WVRQAPGKGLEWIA YISSGRSNIYY ADTVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAR SWG YFDV WGQGTTVTVSS
6	huAb1VH. 1A/VL.1A	CDR-H1	Residuos 26-35 de SEQ ID NO.:15	GFTFSDYGMN
7	huAb1VH. 1A/VL.1A	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:15	YISSGRSNIYYADTVKG
8	huAb1VH. 1A/VL.1A	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO.:15	SWG YFDV
16	huAb1VH.1A/VL. 1A VL	VL		DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCK KSSQSLL NSGNQKNYLT WFQQKPGQPPKLLIY WASTR ESGVPDRFSGSGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYC QNDYTYPLT FGGQGTKLEIK
10	huAb1VH. 1A/VL.1A	CDR-L1	Residuos 24-40 de SEQ ID NO.:16	KSSQSLLNSGNQKNYLT
11	huAb1VH. 1A/VL.1A	CDR-L2	Residuos 56-62 de SEQ ID NO.:16	WASTRES
12	huAb1VH. 1A/VL.1A	CDR-L3	Residuos 95-103 de SEQ ID NO.:16	QNDYTYPLT

Como se describió anteriormente, las CDR de las versiones humanizadas de las regiones VH y VL de Ab1 fueron idénticas al anticuerpo murino Ab1.

Humanización del anticuerpo antagonista anti-CD40 3 (Ab3)

Los anticuerpos humanizados también se generaron en base a las secuencias de CDR pesadas variables (VH) y variables ligeras (VL) de Ab3. Las secuencias de la línea germinal humana se seleccionaron para construir anticuerpos Ab3 humanizados injertados con CDR, donde los dominios CDR de las cadenas VH y VL de Ab3 se injertaron en diferentes secuencias aceptoras de la cadena ligera y pesada humana. En base a los alineamientos con las secuencias VH y VL del anticuerpo monoclonal Ab3, se seleccionaron las siguientes secuencias humanas como aceptoras:

1. IGHV3-69*06 e IGHJ6*01 para construir las secuencias aceptoras de la cadena pesada
2. IGHV1-18*01 e IGHJ6*01 como una aceptora alternativa para construir la cadena pesada
3. IGKV2-29*02 e IGKJ2*01 para construir las secuencias aceptoras de la cadena ligera
4. IGKV2-28*01 e IGKJ2*01 como una aceptora alternativa para construir la cadena ligera

Los anticuerpos injertados con CDR se prepararon injertando las correspondientes CDR VH y VL de Ab3 en las secuencias aceptoras descritas en 1-4 anteriormente.

Para generar el anticuerpo humanizado con mutación(ones) restauradora(s) del marco, se identificaron e introdujeron un número de mutaciones del marco en los anticuerpos injertados con CDR. Estas mutaciones se introdujeron mediante el uso de técnicas estándar, incluida la síntesis *de novo* del dominio variable con la(s) mutación(ones) restauradora(s) y cebadores oligonucleotídicos mutagénicos en reacciones en cadena de la polimerasa. Se construyeron diferentes combinaciones de mutaciones, incluidas las mutaciones restauradoras, para cada uno de los anticuerpos injertados con CDR (que contienen las CDR del anticuerpo Ab3). (Nota: Los números de los residuos para las mutaciones mencionadas a continuación se basan en el sistema de numeración de Kabat).

Para las cadenas pesadas Ab3, uno o más de los siguientes residuos de interfaz de Vernier y VH/VL se mutaron de manera restauradora: M48I, V67A, I69L. Además, se consideraron cambios a Q1E. La mutación Q1E se introdujo para evitar la formación de piroglutamato.

Para las cadenas ligeras Ab3, uno o más de los siguientes residuos de interfaz de Vernier y VH/VL se mutaron de manera restauradora: Y36F, L46Y.

Las descripciones de las regiones variables de los anticuerpos humanizados derivados de Ab3 monoclonal murino se describen a continuación:

- huAb3VH.1z es una VH Ab3 humanizado injertado con CDR que contiene las secuencias marco IGHV1-69*06 e IGHJ6*01.
- huAb3VH.1 se basa en huAb3VH.1z con un cambio Q1E para evitar la formación de piroglutamato
- huAb3VH.1A es un diseño humanizado basado en huAb3VH.1 y contiene 3 mutaciones restauradoras en marco adicionales: M48I, V67A, I69L.
- huAb3VH.1b es un diseño intermedio entre huAb3VH.1 y huAb3VH.1A y contiene 1 mutación restauradora en marco propuesta: I69L.
- huAb3VL.1 es una VL Ab3 humanizado injertado con CDR que contiene las secuencias marco IGKV2-28*01 e IGKJ2*01.
- huAb3VL.1A es un diseño humanizado basado en huAb3VL.1 y contiene 2 mutaciones restauradoras en marco: Y36F, L46Y.
- huAb3VL.1B es un diseño intermedio entre huAb3VL.1 y huAb3VL.1A. Contiene 1 mutación restauradora en marco propuesta: L46Y.

Tenga en cuenta también que*IGHV1-69_IGHJ6 se compone de secuencias de línea germinal IGHV1-69*06 e IGHJ6*01.

Las regiones variables humanizadas se clonaron después en vectores de expresión de IgG para la caracterización funcional de nueve anticuerpos humanizados diferentes basados en las siguientes combinaciones de regiones variables de la cadena pesada y ligera:

- A. huAb3VH.1/VL.1
- B. huAb3VH.1B/VL.1
- C. huAb3VH.1
- D. huAb3VH.1/VL.1A
- E. huAb3VH.1B/VL.1A
- F. huAb3VH.1A/VL.1A
- G. huAb3VH.1/VL.1B
- H. huAb3VH.1B/VL.1B
- I. huAb3VH.1A/VL.1B

Las secuencias de aminoácidos de la región variable y de CDR de los anticuerpos humanizados anteriores se describen en la Tabla 12 a continuación.

TABLA 12. Secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos Ab3 humanizados

SEQ ID NO:	Región del clon	Región del Anticuerpo	Residuos	Secuencia de aminoácidos
52	huAb3VH.1/VL.1	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFT SYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSSDYPNY NQKFKDRVITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGYSFDYWGQGT TTVVSS
45	huAb3VH.1/VL. 1	CDR-H1	Residuos 26-35 de SEQ ID NO.:52	GYTFTSYTMH
46	huAb3VH.1/VL. 1	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:52	YINPSSDYPNYHQKFKD
47	huAb3VH.1/VL. 1	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO.:52	WGYSFDY
53	Ab3VH.1/VL.1	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSL HSNGNTYLYWYLQKPGQS PQLLIYRMSTLA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQHLEYPLTFGQGTKEIK
49	huAb3VH.1/VL. 1	CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO.:53	RSSKSLLSHNGNTYLY
50	huAb3VH.1/VL. 1	CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO.:53	RMSTLAS
51	huAb3VH.1/VL. 1	CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO.:53	MQHLEYPLT
54	huAb3VH.1B/VL. 1	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFT SYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSSDYPNY NQKFKDRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGYSFDYWGQGT TTVVSS
45	huAb3VH. 1B/VL.1	CDR-H1	Residuos 26-35 de SEQ ID NO.:54	GYTFTSYTMH

5	46	huAb3VH. 1B/VL.1	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:54	YINPSSDYPNYNQKFKD
10	47	huAb3VH.1B/ VL.1	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO.:54	WGYSFDY
15	53	huAb3VH.1B/VL. 1	VL		DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLL HSNGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYRMSTLA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK
20	49	huAb3VH.1B/VL. 1	CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO.:53	RSSKSLLHSNGNTYLY
25	50	huAb3VH. 1B/VL.1	CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO.:53	RMSTLAS
30	51	huAb3VH. 1B/VL.1	CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO.:53	MQHLEYPLT
35		huAb3VH.1A/VL. 1	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT SYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSSDYPNY NQKFKDRATLTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGYSFDYWGGGT TVTVSS
40	45	huAb3VH. 1A/VL.1	CDR-H1	Residuos 26-35 de SEQ ID NO.:55	GYTFTSYTMH
45	46	huAb3VH. 1A/VL.1	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:55	YINPSSDYPNYNQKFKD
50	47	huAb3VH. 1A/VL.1	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO.:55	WGYSFDY
55	53	huAb3VH.1A/VL. 1	VL		DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLL HSNGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYRMSTLA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK
60	49	huAb3VH. 1A/VL.1	CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO.:53	RSSKSLLHSNGNTYLY
65					

ES 2 774 016 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

50	huAb37VH. 1A/VL.1	CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO.:53	RMSTLAS
51	huAb3VH. 1A/VL.1	CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO.:53	MQHLEYPLT
52	huAb3VH.1/VL. 1A	VL		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT SYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSSDYPNY NQKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGYSFDYWGQGTTVTVSS
45	huAb3VH.1/VL. 1A	CDR-H1	Residuos 26-35 de SEQ ID NO.:52	GYTFTSYTMH
46	huAb3VH.1/VL. 1A	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:52	YINPSSDYPNYHQKFKD
47	huAb3VH.1/VL. 1A	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO.:52	WGYSFDY
56	huAb3VH.1/VL. 1A	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSL HSNGNTYLYWFLQKPGQSPQYLIYRMSTLA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK
49	huAb3VH.1/VL. 1A	CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO.:56	RSSKSLLSHNGHTYLY
50	huAb3VH.1/VL. 1A	CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO.:56	RMSTLAS
51	huAb3VH.1/VL. 1A	CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO.:56	MQHLEYPLT
54	huAb3VH.1B/VL. 1A	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT SYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSSDYPNY NQKFKDRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGYSFDYWGQGTTVTVSS
45	huAb3VH. 1B/VL.1A	CDR-H1	Residuos 26-35 de SEQ ID NO.:54	GYTFTSYTMH

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

46	huAb3VH. 1B/VL.1A	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:54	YINPSSDYPNYHQKFKD
47	huAb3VH. 1B/VL.1A	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO.:54	WGYSFDY
56	huAb3VH.1B/VL. 1A	VL		DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCR RSSKSLL HSNGNTYLY WFLQKPGQSPQYLIY RMSTLA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC MQHLEYPLT FGQGGTKLEIK
49	huAb3VH. 1B/VL.1A	CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO.:56	RSSKSLLHSNGNTYLY
50	huAb3VH. 1B/VL.1A	CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO.:56	RMSTLAS
51	huAb3VH. 1B/VL.1A	CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO.:56	MQHLEYPLT
55	huAb3VH.1A/VL. 1A	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFT SYTMH WVRQAPGGGLEWIG YINPSSDYPNY NQKFKD RATLTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR WGYSFDY WGQGTTVT VSS
45	huAb3VH. 1A/VL.1A	CDR-H1	Residuos 26-35 de SEQ ID NO.:55	GYTFTSYTMH
46	huAb3VH. 1A/VL.1A	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:55	YINPSSDYPNYNQKFKD
47	huAb3VH. 1A/VL.1A	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO.:55	WSYSFDY
56	huAb3VH.1A/VL. 1A	VL		DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCR RSSKSLL HSNGNTYLY WFLQKPGQS PQYLIY RMSTLA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC MQHLEYPLT FGQGGTKLEIK
49	huAb3VH. 1A/VL.1A	CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO.:56	RSSKSLLHSNGNTYLY

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

50	huAb37VH. 1A/VL. 1A	CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO.:56	RMSTLAS
51	huAb3VH. 1A/VL. 1A	CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO.:56	MQHLEYPLT
52	huAb3VH.1/VL. 1B	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFT SYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSSDYPNY NQKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGYSFDYWGQGTTTVTVSS
45	huAb3VH.1/VL. 1B	CDR-H1	Residuos 26-35 de SEQ ID NO.:52	GYTFTSYTMH
46	huAb3VH.1/VL. 1B	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:52	YINPSSDYPNYNQKFKD
47	huAb3VH.1/VL. 1B	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO.:52	WSYSFDY
57	huAb3VH.1/VL. 1B	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSL HSNGNTYLYWYLQKPGQS PQYLIYRMSTLA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK
49	huAb3VH.1/VL. 1B	CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO.:57	RSSKSLLSHNGNTYLY
50	huAb3VH.1/VL. 1B	CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO.:57	RMSTLAS
51	huAb3VH.1/VL. 1B	CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO.:57	MQHLEYPLT
54	huAh3VH.1B/VL. 1B	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFT SYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSSDYPNY NQKFKDRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGYSFDYWGQGT TVTVS S
45	huAb3VH. 1B/VL. 1B	CDR-H1	Residuos 26-35 de SEQ ID NO.:54	GYTFTSYTMH

5	46	huAb3VH. 1B/VL.1B	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:54	YINPSSDYPNYNQKFKD
10	47	huAb3VH. 1B/VL.1B	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO.:54	WSYSFDY
15	57	huAb3VH.1B/VL. 1B	VL		DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSKSLL HSNGNTYLYWYLQKPGQS PQYLIYRMSTLA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK
20	49	huAb3VH. 1B/VL.1B	CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO.:57	RSSKSLLHSNGNTYLY
25	50	huAb3VH. 1B/VL.1B	CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO.:57	RMSTLAS
30	51	huAb3VH. 1B/VL.1B	CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO.:57	MQHLEYPLT
35	55	huAb3VH.1A/VL. 1B	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT SYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSSDYPNY NQKFKDRATLTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGYSFDYWGQGTITVTVSS
40	45	huAb3VH. 1A/VL.1B	CDR-H1	Residuos 26-35 de SEQ ID NO.:55	GYTFTSYTMH
45	46	huAb3VH. 1A/VL.1B	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:55	YINPSSDYPNYNQKFKD
50	47	huAb3VH. 1A/VL.1B	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO.:55	WSYSFDY
55	57	huAb3VH.1A/VL. 1B	VL		DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSKSLL HSNGNTYLYWYLQKPGQS PQYLIYRMSTLA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK
60	49	huAb3VH. 1A/VL.1B	CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO.:57	RSSKSLLHSNGNTYLY

5

10

50	huAb37VH. 1A/VL.1B	CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO.:57	RMSTLAS
51	huAb37VH. 1A/VL.1B	CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO.:57	MQHLEYPLT

15

Como se describió anteriormente, las CDR de las versiones humanizadas de las regiones VH y VL de Ab3 fueron idénticas al anticuerpo murino Ab3.

Como Ab3 no se unió a CD40 cyno (véase el Ejemplo 1), se seleccionaron versiones humanizadas de Abl para su posterior análisis.

20

Ejemplo 3: Modificación de VL CDR1 de los anticuerpos Ab1 humanizados

25

El examen de las secuencias VH y VL de anticuerpos Abl humanizados descritas anteriormente identificó un motivo de secuencia potencial de desamidación (un motivo "NS") expuesto en el CDR1 de la cadena ligera. El sitio del motivo "NS" que se identificó puede conducir a la desamidación e hidrólisis, y conducir a un intermedio de succinimida y aspartil-ASP o iso-ASP. Por lo tanto, el motivo de la secuencia se modificó a partir de las secuencias de VL CDR1 de Abl humanizado. Eliminar el motivo "NS" permitiría mejorar la fabricación de los anticuerpos.

30

La modificación adicional de Abl humanizado resultó en seis anticuerpos diferentes. En particular, cuatro retuvieron la actividad antagonista, mientras que dos se convirtieron en anticuerpos agonistas (huAblv4 y huAb1v3). Como se muestra en la Tabla 14, huAblv4 y huAb1v3 mostraron actividad agonista según lo determinado por un ensayo reportero de huCD40, mientras que no mostraron actividad antagonista según lo determinado en un ensayo Jurkat/Reportero. Las secuencias de aminoácidos de VH y VL, así como también las CDR, de los anticuerpos variantes de Abl humanizado (huAb1v1 a huAblv6) se describen a continuación en la Tabla 13.

35

TABLA 13. Secuencia de aminoácidos de VH y VL de la variante del anticuerpo Ab1 humanizado (huAb1v#)

40

45

50

55

60

65

SEQ ID NO.:	Clon	Región del Anticuerpo	Residuos	Secuencia de aminoácidos
13	huAblv3	VH		EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWWVRQAPGKGLEWVS YISSGRSNIYY ADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR SWG YFDVWGQGTTVTVSS
6	huAb1v3	CDR-H1	Residuos 26-35 de SEQ ID NO.:13	GFTFS DYGMN
	huAb1v3	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:13	YISSGRSNIYYADTVKG
8	huAb1v3	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO.:13	SWG YFDV
43	huAb1v3	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSL LN LGNQKNYLTWFQQKPGQPPKLLIY WASTR ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVA VYYCQNDYTYPLTFGQGT KLEIK
17	huAb1v3	CDR-L1	Residuos 24-40 de SEQ ID NO.:43	KSSQSLNLGNQKNYLT

ES 2 774 016 T3

5	11	huAb1v3	CDR-L2	Residuos 56-62 de SEQ ID NO.:43	WASTRES
	12	huAb1v3	CDR-L3	Residuos 95-103 de SEQ ID NO.:43	QNDYTYPLT
10	15	huAb1v4	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRSNIYY ADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWG YFDVWGQGTTVTVSS
15	6	huAb1v4	CDR-H1	Residuos 26-35 de SEQ ID NO.:15	GFTFSDYGMN
	7	huAb1v4	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:15	YISSGRSNIYYADTVKG
20	8	huAb1v4	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO.:15	SWG YFDV
25	77	huAb1v4	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLL NPGNQKNYLTWFQQKPGQPPKLLIYWASTR ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQNDYTYPLTFGQGGTKLEIK
30	74	huAb1v4	CDR-L1	Residuos 24-40 de SEQ ID NO.:77	KSSQSLLNPGNQKNYLT
	11	huAb1v4	CDR-L2	Residuos 56-62 de SEQ ID NO.:77	WASTRES
35	12	huAb1v4	CDR-L3	Residuos 95-103 de SEQ ID NO.:77	QNDYTYPLT
40	15	huAb1v5	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRSNIYY ADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWG YFDVWGQGTTVTVSS
45	6	huAb1v5	CDR-H1	Residuos 26-35 de SEQ ID NO.:15	GFTFSDYGMN
	7	huAb1v5	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:15	YISSGRSNIYYADTVKG
50	8	huAb1v5	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO.:15	SWG YFDV
55	18	huAb1v5	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLL NTGNQKNYLTWFQQKPGQPPKLLIYWASTR ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQNDYTYPLTFGQGGTKLEIK
60	19	huAb1v5	CDR-L1	Residuos 24-40 de SEQ ID NO.:18	KSSQSLLNTGNQKNYLT
65	11	huAb1v5	CDR-L2	Residuos 56-62 de SEQ ID NO.:18	WASTRES

12	huAb1v5	CDR-L3	Residuos 95-103 de SEQ ID NO.:18	QNDYTYPLT
15	huAb1v6		VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWVRQAPGKGLEWIAIYISSGRSNIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
6	huAb1v6	CDR-H1	Residuos 26-35 de SEQ ID NO.:15	GFTFSDYGMN
7	huAb1v6	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:15	YISSGRSNIYYADTVKG
8	huAb1v6	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO.:15	SWGYFDV
43	huAb1v6	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLL NLGNQKNYLTWFQQKPGQPPKLLIYWASTR ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVA VYYCQNDYTYPLTFGQGTKLEIK
17	huAb1v6	CDR-L1	Residuos 24-40 de SEQ ID NO.:43	KSSQSLLNLGNQKNYLT
11	huAb1v6	CDR-L2	Residuos 56-62 de SEQ ID NO.:43	WASTRES
12	huAb1v6	CDR-L3	Residuos 95-103 de SEQ ID NO.:43	QNDYTYPLT
15	huAb1v1	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWVRQAPGKGLEWIAIYISSGRSNIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
6	huAb1v1	CDR-H1	Residuos 26-35 de SEQ ID NO.:15	GFTFSDYGMN
7	huAb1v1	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:15	YISSGRSNIYYADTVKG
8	huAb1v1	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO.:15	SWGYFDV
20	huAb1v1	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLL NRGNQKNYLTWFQQKPGQPPKLLIYWASTR ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVA VYYCQNDYTYPLTFGQGTKLEIK
21	huAb1v1	CDR-L1	Residuos 24-40 de SEQ ID NO.:20	KSSQSLLNRGNQKNYLT
11	huAb1v1	CDR-L2	Residuos 56-62 de SEQ ID NO.:20	WASTRES
12	huAb1v1	CDR-L3	Residuos 95-103 de SEQ ID NO.:20	QNDYTYPLT

5

10

15

20

25

30

13	huAb1v2	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFS DYGMN WVRQAPGKGLEWVS YISSGRSNIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARS SWG YFDV WGQGTTTVSS
6	huAb1v2	CDR-H1	Residuos 26-35 de SEQ ID NO.:13	GFTFS DYGMN
7	huAb1v2	CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:13	YISSGRSNIYYADTVKG
8	huAb1v2	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO.:13	SWG YFDV
18	huAb1v2	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK KSSQSLL NTGNQKNYLT WFQQKPGQPPKLLIY WASTR ESGVPDRFSGSGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYC QNDYTYPLT FGQGKLEIK
19	huAb1v2	CDR-L1	Residuos 24-40 de SEQ ID NO.:18	KSSQSLLNTGNQKNYLT
11	huAb1v2	CDR-L2	Residuos 56-62 de SEQ ID NO.:18	WASTRES
12	huAb1v2	CDR-L3	Residuos 95-103 de SEQ ID NO.:18	QNDYTYPLT

35

40

Además de la modificación del motivo "NS" en el VL CDR1, las variantes huAb1v2 y huAb1v3 descritas anteriormente en la Tabla 13 tienen mutaciones en el marco adicionales en sus dominios VH.

La Tabla 14 a continuación proporciona un resumen de las actividades de unión, agonista y antagonista de la variante. Las descripciones de los ensayos se pueden encontrar anteriormente en el Ejemplo 2. El motivo "NS" que se mutó en el VL CDR1 se subraya en la Tabla 14 a continuación. Como se describe en la Tabla 14, los anticuerpos huAb1v4 (que contiene una mutación "P" en el dominio VL CDR1) y huAb1v3 (que contiene una mutación "L" en el dominio VL CDR1 y mutaciones marco dentro de la región VH) mostraron actividad agonista a pesar de ser derivados de un anticuerpo parental que tiene actividad antagonista.

TABLA 14: Secuencia y resumen funcional para los anticuerpos variantes humanizados

45

50

55

60

65

Variantes 163-2.1F2.2B5 humanizadas	Secuencia de VL LCDR1 (KSSQSLLNSGNQKNYLT (SEQ ID NO: 10))	Bloqueo de sCD40L	Agonista: ensayo reportero de huCD40 IC50 nM	Antagonista: ensayo Reportero/Jurkat IC50 nM
huAb1v4	KSSQSLL <u>NP</u> GNQKNYLT (SEQ ID NO: 74)	Sí	49	No
huAb1v6	KSSQSLL <u>NL</u> GNQKNYLT (SEQ ID NO: 17)	Sí	No	85,0
huAb1v1	KSSQSLL <u>NR</u> GNQKNYLT (SEQ ID NO: 21)	Sí	No	55
huAb1v2*	KSSQSLL <u>NT</u> GNQKNYLT (SEQ ID NO: 19)	Sí	No	>100
huAb1v5	KSSQSLL <u>NT</u> GNQKNYLT (SEQ ID NO: 19)	Sí	No	>100

huAb1v3*	KSSQSLL <u>NL</u> GNQKNYLT (SEQ ID NO: 17)	Sí	79	No
*Diferencias de marco adicionales en VH				

Se seleccionó el anticuerpo humanizado anti-CD40 huAb1v1 para su posterior estudio y mejora.

Ejemplo 4: Modificación de HC CDR2 del anticuerpo anti-CD40 huAb1v1

De las variantes descritas en el Ejemplo 3, se seleccionó el anticuerpo huAb1v1 para su posterior análisis. Para mejorar aún más la potencia de este anticuerpo, se produjeron variantes de la cadena pesada (HC) huAb1v1 que contenían mutaciones dentro del dominio HC CDR2. Se realizaron diecisiete variantes adicionales (denominadas huAb1v1CDR2v1 a v17). Las regiones HC variantes se combinaron con el LC huAb1v1 (SEQ ID NO: 20) para estudios de actividad para determinar la actividad agonista y antagonista. Se fabricaron diecisiete cadenas pesadas variantes, y los estudios de actividad *in vitro* mostraron que, en general, las variantes conservaban su actividad antagonista y su potencia diversa en comparación con huAb1v1. La Tabla 15 muestra que mientras las variantes de anticuerpos mantenían la actividad antagonista, la potencia de cada variante varió.

TABLA 15: Resumen funcional para las variantes de CDR2 HC huAb1v1.

Variantes modificadas de	Antagonista: ensayo Reportero/Jurkat (IC50 nM)
huAb1v1CDR2	
huAb1v1CDR2v17	503,8
huAb1 v1CDR2v16	30,15
huAb1 v1CDR2v15	339,7
huAb1v1CDR2v14	21,86
huAb1 v1CDR2v13	62,44
huAb1v1CDR2v12	236,1
huAb1v1CDR2v11	>1000
huAb1 v1CDR2v10	23,04
huAb1v1CDR2v9	7,06
huAb1v1CDR2v8	>1000
huAb1v1CDR2v7	2,69
huAb1v1CDR2v6	>1000
huAb1v1CDR2v5	>1000
huAb1v1CDR2v4	563,4
huAb1v1CDR2v3	218,7
huAb1v1CDR2v2	>1000
huAb1v1CDR2v1	>1000

Todas las variantes de huAb1v1 HC se mutaron en la posición S55, como se describe a continuación en la Tabla 16 (la posición 55 está subrayada).

TABLA 16: Secuencias de aminoácidos de las regiones VH adicionales (variantes de huAb1v1VH)

SEQ ID NO:	Clon	VH
15	huAb1v1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWRQAPGKGLEWIAYISSGRSNIYY ADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGIFYDVWGQGTTVTVSS
22	huAb1v1CDR2v1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWRQAPGKGLEWIAYISSGRNIYY ADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGIFYDVWGQGTTVTVSS
23	huAb1v1CDR2v2	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWRQAPGKGLEWIAYISSGRNIYY ADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGIFYDVWGQGTTVTVSS
24	huAb1v1CDR2v3	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWRQAPGKGLEWIAYISSGRENIYY ADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGIFYDVWGQGTTVTVSS
25	huAb1v1CDR2v4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWRQAPGKGLEWIAYISSGRNIYY ADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGIFYDVWGQGTTVTVSS
26	huAb1v1CDR2v5	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWRQAPGKGLEWIAYISSGRVNIYY ADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGIFYDVWGQGTTVTVSS
27	huAb1v1CDR2v6	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWRQAPGKGLEWIAYISSGRNIYY ADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGIFYDVWGQGTTVTVSS
28	huAb1v1CDR2v7	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWRQAPGKGLEWIAYISSGRNIYY ADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGIFYDVWGQGTTVTVSS
29	huAb1v1CDR2v8	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWRQAPGKGLEWIAYISSGRNIYY ADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGIFYDVWGQGTTVTVSS
30	huAb1v1CDR2v9	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWRQAPGKGLEWIAYISSGRQNIYY ADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGIFYDVWGQGTTVTVSS

31	huAb1v1CDR2v10	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWRQAPGKGLEWIAYISSGRWNIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGIFYDVWGQGTTTVTVSS
32	huAb1v1CDR2v11	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWRQAPGKGLEWIAYISSGRMNIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGIFYDVWGQGTTTVTVSS
33	huAb1v1CDR2v12	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWRQAPGKGLEWIAYISSGRNIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGIFYDVWGQGTTTVTVSS
34	huAb1v1CDR2v13	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWRQAPGKGLEWIAYISSGRHNIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGIFYDVWGQGTTTVTVSS
35	huAb1v1CDR2v14	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWRQAPGKGLEWIAYISSGRFNIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGIFYDVWGQGTTTVTVSS
36	huAb1v1CDR2v15	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWRQAPGKGLEWIAYISSGRYNIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGIFYDVWGQGTTTVTVSS
37	huAb1v1CDR2v16	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWRQAPGKGLEWIAYISSGRANIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGIFYDVWGQGTTTVTVSS
38	huAb1v1CDR2v17	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWRQAPGKGLEWIAYISSGRPNIIY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGIFYDVWGQGTTTVTVSS

La Tabla 17 a continuación proporciona una comparación de las regiones HC CDR2 de las variantes de huAb1v1 descritas anteriormente, después de la modificación del residuo S55 (en **negrita/subrayado**). La región VH CDR2 de huAb1v1 corresponde a los residuos de aminoácidos 50-66 de SEQ ID NO: 15.

TABLA 17: Alineamiento de las variantes de huAb1v1 HC CDR2 en la posición 55

Variante VH CDR2	HCCDR2 SEQ ID NO: 50	51	52	52 a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
huAb1v1	7	Y	I	S	S	G	R	<u>S</u>	N	I	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v1	58	Y	I	S	S	G	R	<u>I</u>	N	I	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v2	59	Y	I	S	S	G	R	<u>D</u>	N	I	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v3	60	Y	I	S	S	G	R	<u>E</u>	N	I	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v4	61	Y	I	S	S	G	R	<u>R</u>	N	I	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v5	62	Y	I	S	S	G	R	<u>V</u>	N	I	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v6	63	Y	I	S	S	G	R	<u>L</u>	N	I	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v7	42	Y	I	S	S	G	R	<u>G</u>	N	I	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v8	64	Y	I	S	S	G	R	<u>I</u>	N	I	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v9	65	Y	I	S	S	G	R	<u>Q</u>	N	I	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v10	66	Y	I	S	S	G	R	<u>W</u>	N	I	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v11	67	Y	I	S	S	G	R	<u>M</u>	N	I	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v12	68	Y	I	S	S	G	R	<u>K</u>	N	I	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v13	69	Y	I	S	S	G	R	<u>H</u>	N	I	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v14	70	Y	I	S	S	G	R	<u>F</u>	N	I	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v15	71	Y	I	S	S	G	R	<u>Y</u>	N	I	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v16	72	Y	I	S	S	G	R	<u>A</u>	N	I	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v17	73	Y	I	S	S	G	R	<u>P</u>	N	I	Y	A	D	T	V	K	G

La región variable de la cadena pesada de huAb1v1CDR2v7 se seleccionó por tener propiedades particularmente ventajosas sobre las otras variantes que se produjeron y describieron anteriormente en las Tablas 15-17. En particular, huAb1v1CDR2v7 tiene una mutación en su HC CDR2 identificada como S55G. Específicamente, se determinó que un anticuerpo que contiene la VL del anticuerpo huAb1v1 (SEQ ID NO: 20; ver Tabla 13) y VH huAb1v1CDR2v7 tiene una actividad antagonista aumentada 20X en comparación con el anticuerpo huAb1v1.

La VL de huAbv1 y la VH de huAb1v1CDR2v7 se expresaron en el contexto de dos regiones constantes diferentes de IgG1 humana. Se seleccionó una región constante de IgG1 porque su función efectora estaba disminuida (hCg1, z, no L234A, L235A o LALA) y la otra región constante de IgG1 se seleccionó porque su función efectora estaba disminuida y tenía un conjunto de mutaciones que mejoraban la unión a FcRn (hCg1, z, no L234A, L235A-T250Q, M428L o LALA-QL). Las tablas 18 y 19 a continuación proporcionan la información de la secuencia de aminoácidos para las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos anti-CD40 humanos Ab101 (VL huAbv1 / VH huAb1v1CDR2v7 / hCg1/k-LALA-QL) y Ab102 (VL huAbv1 / VH huAb1v1CDR2v7 / hCg1/k-LALA-QL). Los residuos de aminoácidos de las CDR individuales de cada secuencia VH o VL se indican en negrita. Las regiones constantes están subrayadas en la Tabla 19.

TABLA 18. Secuencias de aminoácidos de VH y VL de los anticuerpos anti-hCD40 Ab101 y Ab102.

SEQ ID NO	Región de la proteína			Secuencia
28	Ab101	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFS DYGMN WVRQAPGKGLEWIA YISSGRGNIYY ADTVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAR SWG YFDV WGQGT
6		CDR-H1	Residuos 26-35 de SEQ ID NO.: 28	GFTFSDYGMN
42		CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.: 28	YISSGRGNIYYADTVKG
8		CDR-H3	Residuos 99 -105 de SEQ ID NO.:28	SWG YFDV
20	Ab101	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK SQSLL NRGNQKNYLT WFQQKPGQPPKLLI WASTR ESGVPDR FSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVA VYYC QNDYTYPLT FGQGT
21		CDR-L1	Residuos 24-40 de SEQ ID NO.: 20	KSSQSLLNRGNQKNYLT
11		CDR-L2	Residuos 56-62 de SEQ ID NO.: 20	WASTRES
12		CDR-L3	Residuos 85 -93 de SEQ ID NO.:20	QNDYTYPLT
28	Ab102	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFS DYGMN WVRQAPGKGLEWIA YISSGRGNIYY ADTVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAR SWG YFDV WGQGT
6		CDR-H1	Residuos 26-35 de SEQ ID NO.: 28	GFTFSDYGMN
42		CDR-H2	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.: 28	YISSGRGNIYYADTVKG

8		CDR-H3	Residuos 99 -105 de SEQ ID NO.:28	SWGYFDV
20	Ab102	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLL NRGNQKNYLTWFQKPGQPPKLLIYWASTR ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQNDYTYPLTFGQGTKLEIK
21		CDR-L1	Residuos 24-40 de SEQ ID NO.:20	KSSQSLLNRGNQKNYLT
11		CDR-L2	Residuos 56-62 de SEQ ID NO.:20	WASTRES
12		CDR-L3	Residuos 85 -93 de SEQ ID NO.:20	QNDYTYPLT

TABLA 19. Secuencias de aminoácidos de la cadena pesada (HC) y cadena ligera (LC) de los anticuerpos anti-hCD40 Ab101 y Ab102.

Clon	SEQ ID NO:	VH
Ab101-HC	39	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYG MNWVRQAPGKGLEWIAIYISSGRGNIYYADTVK GRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS WGYFDVWGOGTTTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLOSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGOPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWOOGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
Ab101-LC	40	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNRGN QKNYLTWFQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDR FSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYP LTFGOGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEOLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVOWKVDNALQSGNSOESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH OGLSSPVTKSFNRGEC

5	Ab102-HC	41	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYG MNWVRQAPGKGLEWIAIYISSGRGNIYYADTVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS WGYFDVWGOGTTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLOSSGLYSLSSVWTPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPAPEAAAGG PSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISK AKGOPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWOOGNVFCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK
25	Ab102-LC	40	DIVMTQSPDSEAVSEGERATINCKSSQSLLNRGN QKNYLTWFQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDR FSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYP LTFGOGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEOLKSGTAS VVCEENNFYPREAKVOWKVDNAEQSGNSOESVT EODSKDSTYSESSTETESKADYEKHKVYACEVTH OGESSPVTKSFNRGEC

Ejemplo 5: Caracterización funcional de anticuerpos antagonistas humanizados anti-hCD40 Ab101 y Ab102

40 *Análisis in vitro*

Los anticuerpos humanizados anti-CD40 Ab101 y Ab102 mostraron actividad antagonista similar a los hallazgos en el ensayo reportero descrito en el Ejemplo 1. Dado que la actividad agonista residual está relacionada con riesgos potenciales, se desarrolló un ensayo agonista de células B. En este ensayo, los anticuerpos se evalúan para determinar la inhibición de la regulación positiva de CD86 en células B humanas. Las células B humanas expresan constitutivamente CD40 y la señalización a través de CD40 conduce a la activación de células B tal como se mide mediante la regulación positiva de CD86 en la superficie. Las células B se activaron con dosis bajas de anti-IgM e IL4 y se añadieron anticuerpos antagonistas de CD40. El aumento de la activación de las células B se midió como una regulación positiva de CD86, que se observó en presencia del agonista CD40 pero no del antagonista CD40 Ab, lo que sugiere actividad agonista indetectable del candidato principal *in vitro*. Para medir la actividad antagonista, las células B humanas primarias se cultivaron con una línea de células T humanas que expresa CD40L que conduce a la activación de las células B y la regulación positiva de la expresión de CD86 a través de la interacción CD40/CD40L. La capacidad del antagonista CD40 para inhibir la regulación positiva de CD86 de las células B humanas primarias se midió y se mostró una fuerte actividad antagonista del anticuerpo anti-CD40 Ab101, como se muestra en la Figura 2B. La Figura 2A muestra que el anticuerpo Ab101 no tiene actividad agonista. Notablemente, como se describe en la Figura 2B, el anticuerpo Ab101 tenía un valor de IC₅₀ de 1,337 en comparación con el anticuerpo antagonista Blb (Boehringer Ingelheim) que tuvo un valor de IC₅₀ de 4,213 y el anticuerpo agonista AD11 (Astellas) que tuvo un valor de IC₅₀ de 0,1906. Por lo tanto, el anticuerpo Ab101 (y Ab102 dadas las regiones variables idénticas) es un fuerte antagonista de CD40 y no muestra actividad agonista *in vitro* sustancial.

60 *Análisis in vivo*

Para probar la actividad *in vivo* del anticuerpo Ab101, se estableció un modelo de generación de anticuerpos humanos y supervivencia de células B. Brevemente, cuando las PBMC humanas aisladas de donantes sanos se transfirieron a ratones *scid* inmunocomprometidos, la generación de IgG humana en respuesta a antígenos de ratón se midió 14 días después. Adicionalmente, el análisis FACS de esplenocitos de estos ratones indicó injerto y supervivencia de células B

humanas. Se midió una respuesta específica de antígeno que incluye un desafío con la vacuna de toxoide tetánico (TetTox) y midiendo IgG específica de anti-TetTox (Naito, 2000; Jeurissen, 2004).

El tratamiento de estos ratones hu *scid* con dosis semanales de anti-CD40 humano (Ab101, 5 mg/kg IP) resultó en una inhibición > 85 % de la producción de IgG humana (Figura 3A) y la supervivencia de las células B (Figura 3B), lo que demuestra claramente que el anticuerpo está activo *in vivo*. Específicamente, la Figura 3A muestra que el anticuerpo Ab101 pudo inhibir la producción de IgG en comparación con el control de Ig, y la Figura 3B indica que la administración del anticuerpo Ab101 en el modelo de hu *scid* anterior inhibió la supervivencia de las células B.

Ejemplo 6: Análisis de epítomos de Fab Ab102

Mediante el uso de Fab Ab102, se realizaron estudios de cristalografía para determinar el epítipo al que se une Fab Ab101. Como se describió anteriormente, las secuencias de VH y VL de los anticuerpos Ab101 y Ab102 son las mismas y, por lo tanto, el uso de Fab Ab102 en el siguiente estudio de estructura cristalina es representativo de las características de unión de ambos anticuerpos Ab101 y Ab102.

Se determinaron las estructuras cristalinas para Ab102 Fab solo y para Ab101 Fab en complejo con el antígeno CD40. Se obtuvieron los cristales y se recopilaron datos en la línea de luz IMCA-CAT 17ID. Una estructura de cristal de Ab102 Fab se resolvió a una resolución de 1,74 Å y la estructura del complejo Ab102 Fab/CD40 se resolvió a una resolución de 2,84 Å. Las estructuras cristalinas proporcionaron la identificación del epítipo conformacional 3D de Ab102 Fab.

Identificación del epítipo conformacional 3D de Ab102 Fab

Los contactos entre Ab102 Fab y CD40 implican enlaces de hidrógeno críticos e interacciones hidrófobas que estabilizan la interfaz. Se generó una lista de contactos moleculares (que miden menos de 4,0 Å) mediante el uso del programa NCONT en el conjunto de programas CCP4. Los contactos se midieron entre los dos monómeros cristalográficos de CD40 separados y las cadenas ligeras y pesadas correspondientes del Ab102 Fab. Se observaron contactos adicionales entre el Ab102 Fab y un dímero cristalográfico de CD40 (el dímero creado por los contactos del cristal). En base a esta información, el epítipo de la unión de Ab102 Fab comprende la región topográfica definida por Cys62-Phe67, Gln79-Cys83, Arg90-Thr99, Thr24-Cys37 de CD40.

Materiales y métodos

Preparación y purificación del antígeno CD40:

Una secuencia de ADN que codifica el dominio extracelular de CD40 humano (aminoácidos 1-193) se clonó en un vector pHybE seguido de un sitio de escisión de la proteasa Tev C-terminal en marco y una etiqueta de hexahistidina (SEQ ID NO: 115). El plásmido se transfectó en células HEK293 6e (MRL) a 1×10^6 células/ml mediante el uso del reactivo de transfección Polietilenimina (PEI, Polysciences Inc) a una relación PEI:ADN de 4:1. El cultivo celular transfectado se alimentó con triptona-N1 (hasta 0,5 %) a las 24 h después de la transfección. El día 7 posterior a la transfección, el cultivo celular transfectado se eliminó mediante centrifugación seguido de filtración a través de un filtro PES de 0,2µ (Corning). El medio depurado se intercambió con tampón a PBS, pH 7,4 mediante el uso de un sistema Kwick TFF equipado con membranas de 10 kDa (GE Healthcare) y se cargó en una columna HisTrap FF de 5 ml (GE Healthcare) equilibrada con PBS, pH 7,4. La columna se lavó con imidazol 25 mM en PBS, pH 7,4 y la proteína unida se eluyó con imidazol 250 mM en PBS, pH 7,4. La proteína eluida se concentró mediante el uso de dispositivos de filtro de centrifuga Amicon Ultra-15 (Millipore) con un límite de peso molecular de 10 kDa, y se purificó adicionalmente por SEC en una columna Superdex 200 26/60 (GE Healthcare) equilibrada y corrida con PBS, pH 7,4. Las fracciones que contenían CD40 se agruparon, la concentración se midió por absorbancia a 280 nm y las muestras se analizaron por SEC, SDS-PAGE y espectrometría de masas. [CD40(h)(21-193)]-Tev-His6 ("His6" descrito como SEQ ID NO: 115) se almacenó en alícuotas a - 80 °C.

Preparación y purificación del fragmento Fab de CD40 Ab102:

El fragmento Fab de CD40 Ab102 se preparó mediante escisión con papaína del mAb parental como se detalla a continuación. La papaína se activó con cisteína 50 mM en PBS, tampón con pH 7,4. mAb CD40 Ab102 [hu IgG1/k] LALA QL en PBS, tampón con pH 7,4 se mezcló con papaína a una relación en peso de papaína a mAb de 1:100 y se incubó durante 1 hora a 37 °C. La reacción se inactivó con yodoacetamida 5 mM. La mezcla se purificó en 10 ml de resina Mab SelectSure (GE Healthcare) donde se colectó el fragmento Fab como flujo continuo. El flujo continuo se concentró mediante el uso de un dispositivo centrífugo de corte de peso molecular 10 kDa (MWCO) Ultrafree-15 Biomax (Millipore). La mezcla concentrada se purificó en una columna Sephacryl 200 HiPrep de 2,6 cm x 60 cm (GE Healthcare) preequilibrada en HEPES 50 mM, NaCl 50 mM, tampón pH 7,5. Las fracciones que contenían el fragmento Fab (monitorizadas por absorbancia UV a 280 nm) se agruparon y congelaron a - 80 °C. La pureza de la muestra se evaluó mediante SEC analítica, SDS-PAGE y espectrometría de masas.

Preparación del complejo CD40/Fab de CD40 Ab102:

El CD40 humano recombinante se expresó en un sistema de expresión de mamífero y subsecuentemente se purificó mediante el uso de técnicas bien conocidas en la técnica. Las proteínas Fab de CD40 Ab102 y CD40 humana recombinante se mezclaron a una relación molar de 1,1:1 y se incubaron durante 4 h a 4 °C. La muestra del complejo se cargó en una columna Sephacryl 200 HiPrep de 2,6 cm x 60 cm (GE Healthcare) preequilibrada en HEPES 50 mM, NaCl 50 mM, tampón con pH 7,5 a 1 ml/min. Las fracciones que contenían el complejo (monitorizado por absorbancia UV a 280 nm) se agruparon y concentraron a 18 mg/ml mediante el uso de un dispositivo centrífugo de corte de peso molecular 10 kDa (MWCO) Ultrafree-15 Biomax (Millipore). La pureza de la muestra se evaluó mediante SEC analítica y SDS-PAGE.

Cristalización de Ab102 Fab:

Se suministró Fab solo a 22,5 mg/ml en HEPES 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7,5. Los cristales crecieron por difusión de vapor a 23 °C. El depósito contenía 25 % (p/v) de PMME 550, 0,1 M MES pH 6,5, sulfato de zinc 0,01 M. La gota se realizó mediante la adición de volúmenes iguales de proteína y solución del depósito. Los cristales crecieron como prismas gruesos y se protegieron criogénicamente mediante el uso de la solución de depósito con la adición de 10 % (v/v) de propilenglicol. Los cristales se cosecharon, se lavaron con criosolución y se enfriaron criogénicamente directamente en nitrógeno líquido. Los datos de difracción a 1,74 Å fueron recolectados bajo nitrógeno gaseoso a 100 K en la línea de luz 17ID en la Fuente de Fotones Avanzados en los Laboratorios Nacionales Argonne (Argonne IL).

Cristalización de Ab102 Fab en complejo con el antígeno de CD40:

El complejo Fab se suministró a 18 mg/ml en HEPES 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7,5. El constructo de antígeno usado fue [CD40 (h) (21-193)]-TEV-6His ("His6" descrito como SEQ ID NO: 115). Los cristales crecieron por difusión de vapor a 23 °C. El depósito contenía sulfato de amonio 2 M, fosfato-citrato 0,1 M pH 4,2. La gota se realizó mediante la adición de volúmenes iguales de proteína y solución del depósito. Los cristales crecieron como barras delgadas y se protegieron criogénicamente con sulfato de litio 2,5 M. Los cristales se cosecharon, se lavaron con solución criogénica y se enfriaron criogénicamente directamente en nitrógeno líquido. Los datos de difracción a 2,84 Å se obtuvieron bajo nitrógeno gaseoso a 100 K en la línea de luz 17ID en la Fuente de Fotones Avanzados en los Laboratorios Nacionales Argonne (Argonne IL).

Determinación de la estructura del complejo Ab102 Fab y Ab102 Fab CD40

Los datos de difracción para ambas estructuras cristalinas se procesaron mediante el uso del programa autoPROC de Global Phasing Ltd.

El conjunto de datos de Ab102 Fab se procesó en el grupo espacial C222₁ con las siguientes dimensiones de celda unitaria: a = 64,65 b = 130,4 c = 132,6. Se determinó una solución de reemplazo molecular de máxima probabilidad mediante el uso del programa PHASER mediante el uso de un modelo de búsqueda Fab reportado previamente (Protein Data Bank, entrada 3T0S). Se generaron coordenadas para 1 molécula Fab en base a la solución de reemplazo molecular. El refinamiento preliminar de la solución resultante se realizó mediante el uso de REFMAC y el programa BUSTER. La construcción iterativa del modelo de proteína se realizó mediante el uso del programa COOT y el examen de mapas de densidad electrónica 2Fo-Fc y Fo-Fc. El refinamiento concluyó con la adición de moléculas de agua mediante el uso de BUSTER. Las estadísticas del refinamiento final informaron valores de R_{libre}/R_{trabajo} de 0,23/0,19.

El conjunto de datos del complejo Ab102 Fab CD40 se procesó en el grupo espacial P2₁2₁2 con las siguientes dimensiones de celda unitaria: a = 173,3 b = 76,0 c = 126,1. Se determinó una solución de reemplazo molecular de máxima probabilidad mediante el uso del programa PHASER mediante el uso del Fab Ab102 previamente resuelto que se informó anteriormente. Se encontraron coordenadas para 2 moléculas Fab basadas en la solución de reemplazo molecular. El refinamiento preliminar de la solución resultante se realizó mediante el uso de REFMAC y el programa BUSTER. El modelo para CD40 se construyó manualmente mediante el uso del programa COOT y el examen de mapas de densidad electrónica 2Fo-Fc y Fo-Fc. El refinamiento concluyó con la adición de moléculas de agua mediante el uso de BUSTER. Las estadísticas de refinamiento final informaron valores de R_{libre}/R_{trabajo} de 0,25/0,20.

Ejemplo 7: Potencia de neutralización y actividad agonista de Ab102 en el ensayo de activación de monocitos

Los siguientes métodos se usaron en este ejemplo que examinó la actividad antagonista y agonista de Ab102 *in vitro*.

Ensayo antagonista: La capacidad de Ab102 para bloquear la activación de monocitos mediada por CD40 se evaluó en un ensayo antagonista. Los monocitos purificados se mezclaron con 1 g/ml MEGACD40L (Enzo) en presencia de 80 ng/ml de GM-CSF y 80 ng/ml de IFN a una concentración de 2x10⁶/ml. Se añadieron 50 µl por pocillo en una placa de cultivo de tejido (TC) de fondo en U de 96 pocillos. Las diluciones de los materiales analizados se prepararon en medio de cultivo y se añadieron 50 µl de diluciones a monocitos humanos obtenidos de un donante. Las células se cultivaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante dos días antes de que los sobrenadantes se cosecharan para el análisis de citocinas (TNF) mediante el uso de la plataforma de inmunoensayo Meso Scale Discovery (MSD).

Ensayo agonista: se evaluó la capacidad de Ab102 para inducir la activación de monocitos a través de CD40. MEGACD40L (Enzo) se usó como un control positivo para la activación de monocitos. Los monocitos humanos purificados

se diluyeron a 2×10^6 /ml en medio de cultivo en presencia de 80 ng/ml de GM-CSF y 80 ng/ml de IFN γ , y se añadieron 50 μ l/pocillo en una placa TC de fondo en U de 96 pocillos. Las diluciones de los materiales analizados se prepararon en medio de cultivo y se añadieron 50 μ L de diluciones a los monocitos. Las células se cultivaron a 37 °C, 5 % de CO $_2$ durante dos días antes de que los sobrenadantes se cosecharan para el análisis de citocinas (TNF) mediante el uso de la plataforma de inmunoensayo Meso Scale Discovery (MSD).

Como las células mieloides juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad de Crohn, se desarrollaron los ensayos basados en monocitos mencionados anteriormente para evaluar la actividad funcional de Ab102. La señalización de CD40 induce la activación de los monocitos y, por lo tanto, la producción de citocinas inflamatorias tal como TNF. En las Figuras 5A y 5B, respectivamente, se muestran ensayos representativos antagonistas y agonistas de monocitos para Ab102. Como se muestra en la Figura 5A, Ab102 bloqueó la expresión de TNF de una manera dependiente de la concentración. En el formato de ensayo agonista, el CD40L soluble indujo la producción de TNF a partir de monocitos con una EC $_{50}$ de 1,9 nM, mientras que Ab102 no indujo la producción de TNF a concentraciones de hasta 200 nM. Como se describe en la Figura 5B, los niveles de Ab102 de TNF fueron similares a los del control negativo (IgG no relevante) lo que muestra poca o ninguna producción de TNF detectable. Se obtuvieron resultados consistentes de tres donantes diferentes con los valores de IC $_{50}$ que se muestran en la Tabla 20 a continuación.

Tabla 20. Resumen de la Evaluación Funcional de Ab102 en el ensayo de activación de monocitos

Reactivo	Experimento	Antagonista IC $_{50}$ (nM)
Ab102	1	0,06
	2	0,23
	3	0,11
	Promedio $\pm$ SD	0,13 $\pm$ 0,08

En resumen, los resultados de las pruebas de Ab102 en los ensayos antagonista y agonista descritos anteriormente mostraron que Ab102 es un anticuerpo antagonista anti-CD40 que está sustancialmente libre de actividad agonista sin actividad agonista medible.

Ejemplo 8: Reactividad cruzada de Ab102

Se probó la reactividad cruzada de Ab102 con CD40 de varias especies. Mediante el uso de técnicas estándar, el Ab102 marcado con Alexa 647 demostró una cinética de unión similar tanto para el CD40 humano como para el de mono cynomolgus en la superficie de las células B con un valor de EC $_{50}$ de $0,89 \pm 0,17$ nM en las células humanas y $1,4 \pm 0,15$ nM en las células del mono cynomolgus, como se muestra en la Tabla 21, abajo. No se pudo detectar unión de Ab102 a CD40 de ratón, rata y conejo a concentraciones de hasta 30 μ g/ml (200 nM).

Tabla 21. Resumen de la unión de Ab102 a varios CD40 en la superficie de las células B

Reactivo	Especie	EC $_{50}$ (nM)
Ab102	Humano	$0,89 \pm 0,17$
	Mono	$1,4 \pm 0,15$
	Ratón	ND
	Rata	ND
	Conejo	ND

En resumen, Ab102 se unió a CD40 humano y de mono cynomolgus, pero no mostró unión detectable a CD40 de ratón, rata o conejo mediante el uso de ensayos de unión estándar.

Ejemplo 9: Uso del anticuerpo 138 anti-CD40 de ratón para tratar la colitis por transferencia de células T

Los siguientes métodos se usaron en un estudio *in vivo* para determinar la capacidad de un anticuerpo anti-CD40 de ratón (anticuerpo 138) para tratar la colitis. El anticuerpo 138 anti-CD40 murino tiene características similares a Ab102, por ejemplo, el anticuerpo 138 es un anticuerpo antagonista sin actividad agonista sustancial como Ab102. Por lo tanto, el anticuerpo 138 es representativo de la actividad de Ab102 en el modelo de ratón del Ejemplo 9. A continuación se describe un modelo de colitis por transferencia de células T *in vivo*.

Aislamiento e inyección de células T naive

El Día 0, se colectaron los bazo de ratones balb/c y se colocaron en medio RPMI suplementado con suero bovino fetal al 4 % (medio completo) en hielo. Se obtuvo una suspensión de células individuales por ruptura mecánica y pasando a través de un filtro de células de 100 mm en medios RPMI suplementados con suero bovino fetal al 4 % (medios completos). Las células se colectaron por centrifugación (1250 rpm durante 10 minutos a 4 °C) y se resuspendió en Tampón Robosep (Stem Cell Technologies). La concentración celular se midió mediante el uso de un Mini Contador Celular Moxi (Orflo) y se ajustó a 1×10^8 células/ml en tampón Robosep. Las células T CD4⁺ se aislaron mediante el uso de un kit de perlas magnéticas de selección negativa (Stem Cell Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se purificaron adicionalmente mediante FACS para producir poblaciones de CD4⁺CD45RB^{alto} y CD4⁺CD45RB^{bajo} que se colectaron como el 42 % más brillante y el 12 % más opaco de células, respectivamente. Se contaron las células y se ajustaron a 1×10^6 células/ml, y se inyectaron 0,5 ml (1×10^5 células) por vía intraperitoneal (IP) en ratones SCID.

Tratamiento

El anticuerpo 138 anti-CD40 de ratón se administró luego a varias dosis IP en PBS dos veces/semana a ratones SCID (descritos anteriormente) comenzando en el momento de la inyección celular (tratamiento profiláctico) o después de que la enfermedad se confirmó mediante endoscopia (tratamiento terapéutico). Además, se incluyeron varios grupos de control. Los grupos recibieron 1) 15 mg/kg IP de anticuerpo 951 (un IgG no relevante) en PBS dos veces/semana, o 2) anticuerpo 138 (un anticuerpo que bloquea CD40L) IP en PBS, dos veces/semana. Además, en los estudios de transferencia de células T (TCT), se administró un anticuerpo anti-p40(IL-12/23) o un anticuerpo monoclonal anti-TNF como comparadores de control clínicamente relevantes.

Endoscopia

En varios momentos después de la inyección celular en los ratones, la enfermedad se evaluó mediante colonoscopia. Después de la anestesia con isoflurano, se insertó lentamente una aguja de sonda flexible en el ano y se inyectaron lentamente 300 µL de PBS para eliminar los gránulos fecales. A los animales se les permitió recuperarse de la anestesia y deambular para facilitar el paso de los gránulos restantes (aproximadamente cinco minutos). Los ratones se anestesiaron nuevamente con isoflurano y la sonda de endoscopia (Karl Storz) se insertó en el ano a una profundidad de 3 cm. Las imágenes fotográficas se capturaron a 3, 2 y 1 cm del borde anal. Las imágenes se puntuaron más tarde mediante el uso de la escala detallada en la Tabla 22 a continuación. Los puntajes para cada parámetro en cada una de las tres distancias se combinaron para producir el puntaje de suma del índice de actividad de la enfermedad endoscópica murina (MEDAI), que se muestra en la Tabla 22. El puntaje máximo que se pudo obtener con el puntaje de suma MEDAI fue 24.

En el caso de la dosificación terapéutica, se usó la puntuación endoscópica tres semanas después de la inyección celular para confirmar la enfermedad y agrupar a los animales para el tratamiento.

Tabla 22. Puntaje endoscópico MEDAI

Parámetro	Puntaje	Descripción
Exudado	0	Normal
	1	cubre <50 % de la circunferencia del colon
	2	cubre > 50 % de la circunferencia del colon
Vascularidad	0	Normal
	1	vasos desconectados, vasos pequeños no visibles
	2	vasos grandes no visibles, patrón de brote estelar
	3	sangrado superficial aparente, los vasos parecen tener fugas
Granularidad mucosal	0	Normal
	1	ligera apariencia de adoquines
	2	pronunciada y extensa apariencia de adoquines
	3	protuberancia mucosal, lumen reducido

Histología

Las muestras GI se enviaron en casetes en la orientación del colon completo segmentado por estiramiento, lo que permitió el análisis de toda la longitud del colon y se procesó para embebido en parafina fijado con formalina (FFPE). Los bloques se seccionaron en 5 micras y se montaron en portaobjetos de vidrio antes de realizar la inmunohistoquímica para detectar la molécula adaptadora de unión a calcio ionizada 1 (IBA1) mediante el uso de anticuerpo anti-IBA1 (Cat. núm. 019-19741;

Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). El marcador IBA1 se usó para identificar los macrófagos en las secciones de tejido. Los cortes se contratiñeron con verde metilo, se deshidrataron y se montaron con un cubreobjetos de vidrio.

Los cortes se escanearon después a 4x por el sistema de imágenes Vectra y a se revisaron las imágenes de mosaico de baja potencia 4x antes de la selección de áreas para las imágenes a 20x.

Vectra creó imágenes de los cortes reescaneadas y capturó las imágenes seleccionadas de alta resolución 20x de alta potencia que luego se sometieron a algoritmos de análisis de imágenes en el software inForm (Perkin Elmer). El conjunto de algoritmos inForm que se usó tiene tres algoritmos: los primeros umbrales para la tinción de IBA1 y CD3 en archivos de imágenes espectrales, para eliminar el fondo/manchas extrañas. Los algoritmos subsecuentes segmentan el tejido en tejidos de interés (lámina propia, epitelio, muscularis, submucosa y fondo), y cuantifica CD3 o IBA1 en las imágenes RGB producidas por el primer algoritmo.

Los datos de InForm se exportaron a archivos de texto que se fusionaron en archivos de datos individuales para la segmentación del tejido o datos de segmentación celular.

Sobre la base de la validación de la actividad antagonista en los modelos agudos, se usó un modelo de colitis crónica para establecer la prueba de concepto. Se realizaron tres estudios para evaluar el efecto del bloqueo de la colitis después de la transferencia de células T naive a un huésped inmunocomprometido (ratón SCID). Se investigó un nivel de dosis única tanto en modo de tratamiento profiláctico como terapéutico, mientras que se examinó una respuesta a la dosis completa en modo profiláctico.

Respuesta a la dosis de un anticuerpo 138 anti-CD40 de ratón administrado en el momento de la transferencia celular

La respuesta a la dosis del anticuerpo 138 anti-CD40 de ratón administrado profilácticamente se determinó mediante el uso del modelo de colitis por transferencia de células T. El tratamiento que cubrió un intervalo de dosis (0,5, 1,5, 5 y 15 mg/kg) se inició al momento de la transferencia celular. Las dosis inferiores a 1,5 mg/kg resultaron en una inhibición máxima del puntaje de la suma MEDAI, mientras que 0,5 mg/kg no tuvieron un efecto significativo. La actividad del anticuerpo 138 anti-CD40 de ratón fue equivalente a la dosis estándar de tratamiento con anti-p40IL-12/23 usada como un control positivo. El análisis histológico de las secciones de colon mostró una disminución en los macrófagos (una medida general de inflamación) que se correlacionó bien con la evaluación endoscópica de la enfermedad, como se describe en la Figura 6 y la Figura 7. Específicamente, la Figura 6 describe la inhibición de la respuesta a la dosis del puntaje endoscópico con la administración profiláctica del anticuerpo 138 anti-CD40 de ratón en el día 39 (puntaje terminal). En la Figura 6, RBlow se refiere al grupo de control negativo. Las células CD45RBlow no median la enfermedad. En este modelo de colitis, la enfermedad está mediada por células CD45RBhi que fueron transferidas a los animales. La Figura 7 muestra el número de macrófagos IBA1+ en el colon de los ratones (determinado histológicamente) y describe los niveles más bajos de macrófagos a dosis mayores que 0,5 mg/kg y menores que el control positivo p40

Los niveles de anticuerpo 138 circulante anti-CD40 de ratón se midieron 96 horas después de la dosis final (equivalente al $C_{\text{mínima}}$) y se mostró que respondían a la dosis como se describe en la Figura 8. El nivel de dosis más bajo (0,5 mg/kg) resultó en una concentración < límite inferior de cuantificación (LLOQ) en todos los animales excepto uno en ese grupo.

Respuesta a la dosis de un anticuerpo 138 anti-CD40 de ratón administrado 3 semanas posteriores a la transferencia celular

Cuando se inició el tratamiento con el anticuerpo 138 anti-CD40 de ratón tres semanas posteriores a la inyección celular, después de la confirmación de la enfermedad endoscópica, se observó una inhibición sensible a la dosis del puntaje de suma MEDAI con la dosis más alta (15 mg/kg) alcanzando significación estadística (Figura 9A). El análisis histológico de los macrófagos IBA1+ en el colon como una medida de inflamación mieloide arrojó resultados similares, como se describe en la Figura 9B. La concentración sérica media del anticuerpo 138 medida 72 horas después de la dosis final fue de 191,9 µg/ml en los animales que recibieron 15 mg/kg.

Ejemplo 10: Respuestas de anticuerpos dependiente de células T en monos Cynomolgus

Se realizó un ensayo de respuesta de anticuerpos dependiente de células T (TDAR) en monos cynomolgus. Dos/sexo/grupo recibieron Ab102 a dosis de 0 (sólo vehículo) o 10 mg/kg por vía subcutánea (SC) durante 5 semanas. La hemocianina de lapa californiana (KLH) se administró a todos los animales el día 8. Se colectaron muestras de suero de cada animal a -11, -7, 0, 4, 7, 10, 14 y 21 días en relación con la administración de KLH. Todos los animales fueron devueltos a la colonia de animales de la instalación de prueba después de completar la última colección de sangre programada (Figura 10).

Se descubrió que Ab102 suprimía las respuestas de anticuerpos dependientes de células T de anticuerpos IgM e IgG anti-KLH, en comparación con los animales tratados sólo con vehículo, como se muestra en la Figura 10.

Los hallazgos en este estudio fueron consistentes con la supresión farmacológica de la producción de anticuerpos IgM e IgG dependiente de CD40 después de la administración parenteral de una proteína extraña prototípica. Los resultados

sugirieron que el uso de Ab102 puede ser relevante para tratar el lupus, donde la producción de autoanticuerpos es parte de la enfermedad. Estos hallazgos también respaldaron la relevancia biológica de los monos cynomolgus como una especie apropiada para estudios de toxicología preclínica. Además, el estudio demostró reactividad cruzada con el CD40 de mono cynomolgus, y muestra la actividad *in vivo* de Ab102 en un mecanismo (respuesta de anticuerpos dependiente de T) que se conoce que requiere CD40.

Ejemplo 11: Uso del anticuerpo 138 anti-CD40 de ratón para tratar el lupus eritematoso sistémico (SLE)

Debido a la actividad antagonista del anticuerpo anti-CD40 de ratón 138 que se mostró en los modelos agudos anteriores y en un modelo de colitis (véase el Ejemplo 9), se examinó la eficacia de este anticuerpo anti-CD40 de ratón en modelos de lupus sistémico de ratón eritematoso (SLE). Se usaron dos modelos de SLE: MRL/lpr y NZB/W-F1 (descritos en Theofilopoulos y Kono. 1999. Modelos de lupus murino: estudios específicos de gen y genoma. En Lahita RG, ed., Systemup Lupus Erythematosus, 3ra edición, p. 145). La justificación para evaluar la eficacia del tratamiento anti-CD40 en ratones MRL/lpr y NZB/W-F1 es doble. Primero, los modelos difieren en sus manifestaciones de SLE. Los ratones NZB/W-F1 desarrollan espontáneamente nefritis lúpica y sialoadenitis, mientras que los ratones MRL/lpr desarrollan manifestaciones articulares y cutáneas además de nefritis y sialoadenitis (Andrews y otros J. Exp. Med. 148: 1198-1215. 1978). Dado que los pacientes difieren en sus manifestaciones de SLE, el uso de ambos modelos permite evaluar la eficacia potencial en la mayoría de los pacientes con SLE. Segundo, los ratones MRL/lpr y NZB/W-F1 difieren en la base genética de su enfermedad (Perry y otros J. Biomed. Biotech. 2011, ID del artículo 271694) y, por lo tanto, la eficacia en todos los modelos aumenta la confianza en la traducción a humanos genéticamente heterogéneos.

11.1. Modelo MRL/lpr de SLE

Para determinar la eficacia, se administró a los ratones anticuerpo 138 anti-CD40 de ratón mediante inyección intraperitoneal (i.p.) a partir de las 10 semanas de edad a las dosis indicadas en la Tabla 23, a continuación. Las inyecciones de PBS se usaron como un control negativo, y la prednisolona se usó como un control positivo en el estudio.

Tabla 23.

Grupo	n	Tratamiento	Dosis
1	18	PBS	2x/semana i.p.
2	18	Anticuerpo 138	15 mg/kg 2x/semana i.p.
3	18	Anticuerpo 138	5 mg/kg 2x/semana i.p.
4	18	Anticuerpo 138	1,5 mg/kg 2x/semana i.p.
5	18	Anticuerpo 138	15 mg/kg 1x/semana i.p.
6	18	Prednisolona	10 mg/kg PO sid

La proteinuria se monitoreó semanalmente por Albustix (una marca de barras de inmersión en orina usadas para analizar la proteína en la orina). La proteinuria alta, definida como ≥ 300 mg/dL, comenzó a desarrollarse poco después del inicio del tratamiento, como se muestra en la Figura 11A. Como se describe en la Figura 11A, al finalizar el estudio en el día 63, el 50-60 % de los ratones de control de PBS no tratados y los ratones tratados con 1,5 mg/kg de anticuerpo anti-CD40 habían desarrollado una alta proteinuria. En contraste, casi todos los ratones en los otros grupos de tratamiento mantuvieron baja proteinuria durante todo el estudio. El grupo de tratamiento de 15 mg/kg 1x por semana fue significativamente diferente del control de PBS. También se monitoreó la supervivencia y se encontró que la dosificación a 15 mg/kg 1x por semana y 5 mg/kg 2x por semana extendió significativamente la supervivencia sobre los animales de control de PBS no tratados, como se muestra en la Figura 11B. Cabe señalar que muchos ratones fueron sacrificados debido a la angustia causada por la linfadenopatía causada por la mutación Fas^{lpr} antes de que desarrollaran nefritis. Por lo tanto, la disminución observada en la supervivencia no puede atribuirse únicamente a la nefritis. Sin embargo, estos datos indican que la dosis de anticuerpo anti-CD40 previno de manera dependiente la proteinuria y prolongó la supervivencia de ratones MRL/lpr propensos a lupus.

La eficacia del anticuerpo anti-CD40 para el tratamiento del SLE también se evaluó en secciones de tejido de riñón, glándula salival y articulaciones del tobillo de ratones teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) embebidas en parafina fijadas con formalina (FFPE). La gravedad de la enfermedad en todos los órganos de prueba en los ratones PBS de control no tratados aumentó durante las 9 semanas del estudio a medida que los ratones MRL envejecieron desde las 10 semanas de edad al principio hasta las 19 semanas al final.

En el riñón, el tratamiento con anticuerpos anti-CD40 fue eficaz cuando se administró a 15 mg/kg para reducir la enfermedad glomerular a los 29 y 63 días de tratamiento, como se muestra en la Figura 12A. A medida que la gravedad de la enfermedad glomerular empeoró en ratones MRL envejecidos, el tratamiento con anticuerpos anti-CD40 mantuvo la

eficacia para minimizar la enfermedad glomerular a 5 y 15 mg/kg. El anticuerpo anti-CD40 administrado en una dosis de 15 mg/kg una vez por semana fue tan efectivo como la dosificación dos veces por semana. El anticuerpo anti-CD40 administrado a una dosis de 5 mg/kg dos veces por semana también tuvo casi la misma efectividad. El anticuerpo anti-CD40 administrado a una dosis de 5 y 15 mg/kg fue efectivo en reducir los infiltrados perivascuales (PV) en el riñón a los 29 y 63 días, como se muestra en la Figura 12B, con una tendencia a reducir el tubulointerstial (TI) temprano en la enfermedad, como se muestra en la Figura 12C.

En la glándula salival, el anticuerpo anti-CD40 administrado a una dosis de 1,5, 5 y 15 mg/kg fue eficaz en reducir la inflamación de la glándula salival el día 29, mientras que 15 mg/kg mantuvo la eficacia el día 63 de la terapia (Figura 13A). La infiltración de la glándula salival no cambió significativamente en los ratones no tratados después del día 29.

En el tejido de la articulación del tarso, las dosis administradas de anticuerpos anti-CD40 de 1,5, 5 y 15 mg/kg fueron eficaces en reducir la inflamación alrededor de la articulación en el día 29, mientras que 15 mg/kg mantuvieron la eficacia en el día 63 de la terapia (Figura 13B). En las articulaciones, la inflamación disminuyó en los ratones de 19 semanas en comparación con los ratones de 10 semanas. Sin embargo, el tratamiento con anticuerpos anti-CD40 redujo significativamente la inflamación a casi cero a 15 mg/kg a los 63 días de tratamiento.

La formación del centro germinal (GC) requiere la interacción de las células B y T a través del acoplamiento de CD40 en la célula B del GC con CD40L en las células T auxiliares foliculares (Tfh). Los GC son las estructuras anatómicas donde se generan las células plasmáticas y las células B de memoria, y es donde se produce la maduración por afinidad y el cambio de clase de Ig. Son críticos para el desarrollo de autoanticuerpos patogénicos y de alta afinidad en el SLE.

El anticuerpo 138 anti-CD40 de ratón interrumpió la interacción de las células B y T y evitó la formación del GC. Para evaluar en qué medida se evitó la formación del GC, se determinó el número de células B del GC y células Tfh en el bazo mediante citometría de flujo (Figura 14). Los números de células Tfh fueron significativamente más bajos que los controles en el día 29 en todos los ratones tratados con anticuerpo 138 anti-CD40 independientemente de la dosis. Entre las dosis probadas, el grupo de dosis de 5 mg/kg permaneció significativamente más bajo que el control en el día 63 (Figura 14, ver paneles (i) y (ii)). Las células B del GC también fueron más bajas que el control en el día 29 a todas las dosis de anticuerpos anti-CD40, y permanecieron más bajas en el día 63 en ratones que recibieron anticuerpos anti-CD40 a dosis de 5 y 15 mg/kg. Sin embargo, estas diferencias con respecto a los controles no tratados no fueron estadísticamente significativas. A pesar de los resultados, hubo una tendencia general en los datos hacia un efecto terapéutico en todos los grupos de dosis. Además, en estos experimentos, el anticuerpo anti-CD40 murino demostró poca o ninguna actividad agonista.

Los niveles circulantes de IgG total, además de los niveles de anticuerpos autorreactivos, aumentan con el tiempo en el LSE murino y humano. Por lo tanto, para evaluar el efecto del anticuerpo 138 anti-CD40 sobre la producción de anticuerpos, se examinaron los niveles de IgM e IgG circulantes totales. Además, también se examinaron los anticuerpos anti-dsADN, un autoanticuerpo asociado al lupus común. Se encontró que los niveles totales de IgG en ratones tratados con anticuerpo anti-CD40 a dosis de 15 y 1,5 mg/kg fueron significativamente más bajos que los de los controles no tratados en el día 29, como se describe en la Figura 15A. Los niveles de IgG total significativamente más bajos persistieron hasta el día 63 en ratones tratados con anticuerpo 138 anti-CD40 a 15 mg/kg, como se describe en la Figura 15B. Además, se observaron niveles significativamente más bajos en los ratones tratados con anticuerpo 138 anti-CD40 a 5 mg/kg en este punto de tiempo. No se encontraron diferencias en los niveles circulantes de IgM.

Los títulos de anti-dsADN no fueron significativamente diferentes en los ratones control tratados y no tratados con el anticuerpo 138 anti-CD40 en el día 29, como se describe en la Figura 16A. Sin embargo, para el día 63, los títulos de anti-dsADN habían aumentado sustancialmente en ratones de control no tratados, pero disminuyeron en ratones tratados con 15 y 5 mg/kg de anticuerpo 138 anti-CD40, aunque la diferencia no fue significativa, como se describe en la Figura 16B.

Los resultados obtenidos del estudio anterior (Ejemplo 11.1) indican que el anticuerpo 138 anti-CD40 es eficaz para prevenir el desarrollo de nefritis en los ratones MRL/lpr propensos a lupus. Además, el anticuerpo 138 anti-CD40 previno el desarrollo de la inflamación de las glándulas salivales y las articulaciones. Este estudio sugiere que el anticuerpo 138 antagonista anti-CD40 de ratón, que tiene propiedades similares a Ab102, es eficaz para tratar SLE humano.

11.2. Modelo de ratón NZB/W-F₁ de SLE

También se probó un segundo modelo de ratón para SLE para determinar si el anticuerpo 138 antagonista anti-CD40 de ratón es eficaz para el tratamiento de la enfermedad. Específicamente, para determinar la eficacia del anticuerpo 138 anti-CD40, el anticuerpo se probó en ratones NZB/W-F₁, donde se usaron regímenes tanto profilácticos como terapéuticos de acuerdo con el programa de dosificación descrito en la Tabla 24, a continuación. Como en el estudio 11.1, PBS sirvió como un control negativo y la prednisona fue un control positivo.

Tabla 24

Profiláctico			
Grupo	n	Tratamiento	Dosis
1	20	PBS	i.p. 2x/semana
2	20	Anticuerpo 138	15 mg/kg i.p. 2x/semana
3	20	Anticuerpo 138	1,5 mg/kg i.p. 2x/semana
4	20	Anticuerpo 138	15 mg/kg i.p. 1x/semana
5	20	Prednisolona	10 mg/kg PO sid
Terapéutico			
6	13	PBS	i.p. 2x/semana
7	12	Anticuerpo 138	15 mg/kg i.p. 2x/semana
8	12	Prednisolona	10 mg/kg PO sid

Para el régimen profiláctico, los ratones comenzaron el tratamiento a las 26 semanas de edad. Se verificó que todos los ratones tenían <300 mg/dL de proteína. Para el régimen terapéutico, se usó una inscripción continua; los ratones no tratados se monitorizaron semanalmente para detectar proteinuria y se inscribieron en uno de los 3 grupos de los regímenes terapéuticos cuando desarrollaron proteinuria de ≥ 300 mg/dL.

Tratamiento profiláctico

La proteinuria se monitoreó semanalmente y como se muestra en la Figura 17A, donde aproximadamente el 50 % de los ratones de control no tratados eran proteinúricos a las 32 semanas de edad. En contraste, solo 1 de los ratones tratados con el anticuerpo 138 anti-CD40 y ninguno de los ratones tratados con prednisolona desarrollaron proteinuria alta. Estos resultados fueron significativos de los controles no tratados. La supervivencia, como se muestra en la Figura 17B, refleja el hallazgo de proteinuria con todos los tratamientos significativamente diferentes de los controles de PBS.

Por lo tanto, las dosis de tratamiento de 15 y 1,5 mg/kg previenen la proteinuria y prolongan la supervivencia.

Tratamiento terapéutico

El tratamiento terapéutico con el anticuerpo 138 anti-CD40 también fue eficaz en este segundo modelo de SLE de ratón. Como se muestra en la Figura 18A y la Figura 18B, los ratones tratados con el anticuerpo 138 anti-CD40 desarrollaron baja proteinuria con el tiempo, mientras que ni los ratones de control no tratados ni los ratones tratados con prednisolona desarrollaron baja proteinuria. Según la tasa de recuperación de la proteinuria, como se muestra en la Figura 18B, se estima que el tiempo promedio de recuperación de la proteinuria fue de 23 ± 7 días. El tratamiento con el anticuerpo 138 anti-CD40 también extendió significativamente la supervivencia, como se describe en la Figura 18C.

Producción de saliva

La producción de saliva se midió tanto en ratones tratados profilácticamente como terapéuticamente para evaluar la función de la glándula salival. A los ratones anestesiados se les administró nitrato de pilocarpina y durante un período de 8 minutos se colectó saliva en un hisopo de algodón. La producción de saliva se midió como el aumento del peso neto del hisopo de algodón. En el estudio profiláctico, se encontró que la producción de saliva en ratones de control no tratados era muy variable, pero significativamente diferente de la de los ratones más jóvenes no enfermos NZBWF-1, como se describe en las Figuras 19A y 19B. La variabilidad probablemente se debió al nivel de enfermedad, ya que la mayoría de los ratones control con vehículo con la producción de saliva más baja eran proteinúricos (Figura 19A y 19B, púrpura versus negro en el grupo de vehículo). Sin embargo, es importante destacar que la producción de saliva por los ratones tratados con el anticuerpo 138 anti-CD40 fue comparativamente uniforme (Figura 19A) y significativamente mayor que en los ratones control no tratados. Aunque todas las cohortes tratadas con el anticuerpo 138 anti-CD40 tuvieron una mayor producción de saliva, solo la cohorte tratada con 1,5 mg/kg retuvo importancia cuando se midió en función del peso corporal (Figura 19B). Sin embargo, estos datos indican que el tratamiento profiláctico con el anticuerpo 138 anti-CD40 puede prevenir la pérdida de la función de la glándula salival.

En ratones tratados terapéuticamente, se encontró que los ratones tratados con anticuerpo 138 anti-CD40 tenían una producción de saliva significativamente mayor que los controles no tratados (Figura 20A y 20B). Las Figuras 20A y 20B muestran que la producción de saliva fue preservada por la dosificación terapéutica del anticuerpo anti-CD40. Esto fue evidente si se considera la saliva total o la saliva normalizada para el peso corporal. Notablemente, los ratones no tratados fueron proteinúricos, mientras que ninguno de los ratones tratados con anticuerpo anti-CD40 fueron proteinúricos. Por lo

tanto, se puede concluir que la dosificación terapéutica de un anticuerpo antagonista anti-CD40 que está sustancialmente libre de actividad agonista, previene o revierte la disminución de la función de la glándula salival.

Este estudio indica que el anticuerpo 138 antagonista anti-CD40 fue eficaz en prevenir el desarrollo de nefritis en los ratones NZB/W-F1 propensos a lupus y en rescatar a estos ratones de la nefritis. Además, el anticuerpo anti-CD40 previno el desarrollo de la glándula salival y la inflamación de las articulaciones. Este estudio apoya la hipótesis de que un anticuerpo antagonista anti-CD40 que esté sustancialmente libre de actividad agonista será eficaz en el SLE humano.

Los métodos usados en los Ejemplos 11.1 y 11.2 incluyeron lo siguiente:

Ratones MRL/lpr

MRL/lpr: el anticuerpo anti-CD40 (anticuerpo 138) se administró i.p. a ratones MRL/lpr de 10 semanas de edad en una de 4 dosis; 15 mg/kg, 5 mg/kg, o 1,5 mg/kg dos veces por semana, o 15 mg/kg una vez por semana. Los ratones tratados con PBS (vehículo) i.p. dos veces por semana se incluyeron como un control negativo, y los ratones tratados con 10 mg/kg de prednisolona PO *sid* se incluyeron como un control positivo.

NZB/WF₁: el anticuerpo 138 anti-CD40 se administró a ratones NZB/WF₁ en regímenes tanto profilácticos como terapéuticos. Para el régimen profiláctico, los ratones recibieron anti-CD40 i.p. a partir de las 26 semanas de edad en cualquiera de las dos dosis, dos veces por semana a 15 mg/kg o 1,5 mg/kg. Los ratones que recibieron prednisolona a 10 mg/kg PO *sid* o PBS administrado sirvieron como controles positivos y negativos, respectivamente. Los ratones fueron probados para proteinuria al principio y cualquier ratón con ≥ 300 mg/dL se excluyó del estudio profiláctico. Para el régimen terapéutico, los ratones comenzaron el tratamiento ya que desarrollaron proteinuria de ≥ 300 mg/dL. Los ratones recibieron anti-CD40 i.p. a 15 mg/kg dos veces por semana. Los ratones que recibieron prednisolona a 10 mg/kg PO *sid*, o PBS sirvieron como controles positivos y negativos, respectivamente.

Proteinuria

La orina se analizó semanalmente para determinar el nivel de proteína mediante el uso de tiras reactivas Albustix (Siemens 2191, Pittsburgh, PA). Los ratones se consideraron proteinúricos cuando los niveles de proteína en orina aumentaron a ≥ 300 mg/dL durante al menos 2 pruebas consecutivas o antes de la muerte o la eutanasia.

Citometría de flujo

Se realizaron suspensiones esplénicas de células individuales en solución salina tamponada de Hanks (Invitrogen) con suero bovino fetal inactivado con calor al 1 % (Invitrogen) y 1x penicilina/estreptomicina (Sigma, St Louis, MO). Los eritrocitos se eliminaron por centrifugación y las células se resuspendieron en tampón de tinción (PBS (Invitrogen) con suero bovino fetal inactivado con calor al 1,5 % y azida de sodio al 0,02 % (Sigma)). Las células se tiñeron con anticuerpos contra CD3 (145-2011, BD), CD4 (GK1.5 eBioSciences), ICOS (C398.4A, Biolegend), CXCR5 (L138D7, Biolegend), PD-1 (29F.1A12, Biolegend), GL7 (A488, Biolegend), CD19 (BUV395, BD), CD95 (Jo2, Biolegend). Los anticuerpos se acoplaron directamente a isotiocianato de fluoresceína, ficoeritrina, ficoeritrina y cianina 5, alofococianina, peridinina clorofila y cianina 5.5, o biotina. Las células B totales se identificaron como CD19⁺; células B del GC como CD19⁺, CD95⁺ y GL7⁺; células Tfh como CD3⁺, CD4⁺, ICOS⁺, CXCR5⁺ y PD-1⁺. Las células se analizaron mediante un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) y se analizaron con el software FlowJo (versión 8,5, Treestar Inc.).

Histología

A medida que los ratones de control del vehículo se volvieron moribundos, se colectaron los tejidos de riñón, tobillo y glándulas salivales y se fijaron en formalina tamponada neutra al 10 %. Además, en puntos de tiempo intermedios específicos, estos mismos tejidos y sangre se colectaron de ratones representativos de cada grupo. Los tejidos se fijaron en formalina tamponada neutra al 10 % durante 8 horas, se procesaron y se embebieron en parafina para H&E. Los infiltrados inflamatorios se evaluaron en el riñón, la glándula salival y el tobillo en función de la evaluación de secciones embebidas en parafina (FFPE) fijadas con formalina teñidas con H&E. Para el riñón, un patólogo calificó secciones de 3 μ m H&E en una escala de 0 a 4 para la enfermedad glomerular, infiltración perivascular e infiltración tubulointersticial según los siguientes criterios de puntuación: enfermedad glomerular: 0 = sin enfermedad; 1 = engrosamiento segmentario del mesangio en glomérulos ocasionales; 2 = engrosamiento segmentario a difuso del mesangio en la mayoría de los glomérulos; 3 = engrosamiento difuso del mesangio, hiper celularidad, podocitos agrandados, sin adherencias; 4 = engrosamiento difuso del mesangio con áreas peores que otras con uno o más de los siguientes: proteínas coaguladas, fibrosis, hipocelularidad, podocitos agrandados, adherencias y crecientes de la cápsula de Bowman. Inflamación renal perivascular: 0 = hasta unos pocos linfocitos raros; 1 = pocos linfocitos que forman agregados sueltos; 2 = linfocitos que forman pequeños agregados discretos; 3 = agregado polarizado de linfocitos que se abultan en el lumen de la vena adyacente pero no logran rodear completamente la arteria arqueada; 4 = agregados de linfocitos que rodean completamente la arteria arqueada sin polarización. Infiltración tubulointersticial (TI): 0 = sin infiltrados; 1 = infiltrados TI mínimos a leves; 2 = infiltrados leves entre el 20 % de los túbulos; 3 = infiltrados leves a moderados entre hasta el 50 % de los túbulos; 4 = infiltrados moderados entre y alrededor de > 50 % de túbulos a lo largo de la corteza renal. Los puntajes

de inflamación salival y articular se basaron en los mismos principios con un puntaje 0-4 de infiltrados crecientes dentro del tejido.

Producción de saliva

Para medir la producción de glándulas salivales, los ratones se sedaron primero con oxígeno/isoflurano en una pequeña cámara de aislamiento. Después de la sedación, se administró a los ratones 30 ul i.p. (60 ug) de nitrato de pilocarpina (Sigma). Dos minutos después de la inyección, se colocaron hisopos de seguridad para niños previamente pesados (recortados a -1,5 cm, algodón más bastón) en la boca de los animales detrás de los dientes frontales. Se colocaron los ratones sobre sus costados para permitir la acumulación de saliva en la mejilla y la adsorción por el hisopo de algodón. Después de 8 minutos, se retiraron los hisopos y se pesaron para calcular el peso neto de saliva.

ELISA

Los niveles de IgG e IgM circulantes totales se determinaron por ELISA mediante el uso de kits de eBioscience (cat # 88-50400, 88-50470) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resumen de secuencia

Identificador de secuencia	Proteína	Secuencia
SEQ ID NO: 1	CD40 humano	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINS QCCSLCQPGQKLVS DCTEFTETEC LPCGESEFLDT WNRETHCHQH KYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTC EEGWHCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSD TICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQ QAGTNKTDVVC GPQDRLRALVVIPIIFGILFAILL VLVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFDDLP GS NTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ
SEQ ID NO: 2	Región constante de Ig gamma-1 humana	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT P EVTVCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRWSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 3	Mutante de la región constante de Ig gamma-1 humana	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT P EVTVCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRWSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK

5	SEQ ID NO: 4	Región constante de Ig Kappa humana	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
10	SEQ ID NO: 5	Cadena pesada variable de: Ab1 (murino) (CDR en negritas)	EVQLVESGGGLVKPGGSLKVSCAAS GFTFSDYGMN WVRQAPEKGLEWIA YISSGRSNIYYADTVKGRFTI SRDNAKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCAR SWG YFDV WGTGTTVTSS
15	SEQ ID NO: 6	CDR1 de la cadena pesada de: Ab1 (murino) Ab2 (murino) huAb1v1CDR2v1 a huAb1v1CDR2v17 huAb1v1 huAb1v5 huAb1v6 huAb1v4 huAb1v3 Ab101 Ab102	GFTFSDYGMN
30	SEQ ID NO: 7	CDR2 de la cadena pesada de: Ab1 (murino) huAb1VH.1/VL.1 huAb1v1 huAb1v5 huAb1v3 huAb1v4	YISSGRSNIYYADTVKG
40	SEQ ID NO: 8	CDR3 de la cadena pesada de: Ab2 (murino) Ab1 (murino) huAb1VH.1/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1A huAb1v1 huAb1v1CDR2v1 a huAb1v1CDR2v17 huAb1v5 huAb1v6 huAb1v2 huAb1v3 huAb1v4 Ab101 Ab102	SWG YFDV

5	SEQ ID NO:9	Cadena ligera variable de: Ab1 (murino)	DIVMTQSPSSLTVTAGEMVTMSCKSSQSLLNSGNQ KNYLTWFQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFAG SGSGTDFLTITSSVQAEDLAVYYCQNDYTYPLTFG AGTKLEIK
10	SEQ ID NO: 10	CDR1 de la cadena ligera de: Ab2 (murino) Ab1 (murino) huAb1VH1/VL.1 huAb1VH1A/VL.1 huAb1VH1A/VL.1A	KSSQSLLNSGNQKNYLT
15			
20	SEQ ID NO: 11	CDR2 de la cadena ligera de: Ab1 (murino) Ab2 (murino) huAb1VH.1A/VL.1A huAb1VH.1/VL.1A huAb1VH.1/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1 huAb1v5 huAb1v2 huAb1v6 huAb1v1 huAb1v3 huAb1v4 Ab101 Ab102	WASTRES
25			
30			
35			
40	SEQ ID NO:12	CDR3 de la cadena ligera de: Ab1 (murino) Ab2 (murino)	QNDYTYPLT
45		huAb1VH.1A/VL.1A huAb1VH.1/VL.1A huAb1VH.1/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1 huAb1v5 huAb1v2 huAb1v6 huAb1v1 huAb1v3 huAb1v4 Ab101 Ab102	
50			
55			
60			

5	SEQ ID NO: 13	Cadena pesada variable de: huAb1VH.1/VL.1 huAb1VH.1/VL.1A huAb1v2 huAb1v3	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMN WVRQAPGKGLEWVSYISSGRSNIYYADTVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGYFDV WGQGTTVTVSS
10	SEQ ID NO: 14	Cadena ligera variable de: huAb1VH.1/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQ KNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFG QGKLEIK
15	SEQ ID NO: 15	Cadena pesada variable de: huAb1VH.1A/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1A huAb1v1 huAb1v5 huAb1v4 huAb1v6	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMN WVRQAPGKGLEWIAIYISSGRSNIYYADTVKGRFTISRDNA KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGYFDV WGQGTTVTVSS
20			
25	SEQ ID NO: 16	Cadena ligera variable de: huAb1VH.1A/VL.1A huAb1VH.1/VL.1A	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQ KNYLTWFQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFG QGKLEIK
30			
35	SEQ ID NO: 17	CDR1 de la cadena ligera de: huAb1v6 huAb1v3	KSSQSLLNLGNQKNYLT
40	SEQ ID NO: 18	VL huAb1v5 huAb1v2 (CDR en negritas)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK KSSQSLLNTGNQ KNYLT WFQQKPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QNDYTYPLTFG QGKLEIK
45	SEQ ID NO: 19	CDR1 de la cadena ligera de: huAb1v5 huAb1v2	KSSQSLLNTGNQKNYLT
50	SEQ ID NO: 20	Cadena ligera variable (VL) de: huAb1v1 Ab101 Ab102 (CDR en negritas)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK KSSQSLLNRGNQ KNYLT WFQQKPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QNDYTYPLTFG QGKLEIK
55	SEQ ID NO: 21	CDR1 de la cadena ligera variable de: huAb1v1 Ab101 Ab102	KSSQSLLNRGNQKNYLT
60	SEQ ID NO: 22	Cadena pesada variable (VH) de: huAb1v1CDR2v1 (CDR en negritas)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSDYGMN WVRQAPGKGLEWIAI YISSGR TNIYYADTVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS WGYFDV WGQGTTVTVSS
65			

5	SEQ ID NO: 23	Cadena pesada variable (VH) de: huAb1v1CDR2v2 (CDR en negritas)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMN WVRQAPGKGLEWIA YISSGRDNIYYADTVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS SWGYFDV WGQGTTVTVSS
10	SEQ ID NO: 24	Cadena pesada variable (VH) de: huAb1v1CDR2v3 (CDR en negritas)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMN WVRQAPGKGLEWIA YISSGRENIYYADTVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS SWGYFDV WGQGTTVTVSS
15	SEQ ID NO: 25	Cadena pesada variable (VH) de: huAb1v1CDR2v4 (CDR en negritas)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMN WVRQAPGKGLEWIA YISSGRNIYYADTVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS SWGYFDV WGQGTTVTVSS
20	SEQ ID NO: 26	Cadena pesada variable (VH) de: huAb1v1CDR2v5 (CDR en negritas)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMN WVRQAPGKGLEWIA YISSGRVNIYYADTVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS SWGYFDV WGQGTTVTVSS
25	SEQ ID NO: 27	Cadena pesada variable (VH) de: huAb1v1CDR2v6 (CDR en negritas)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMN WVRQAPGKGLEWIA YISSGRNIYYADTVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS SWGYFDV WGQGTTVTVSS
30	SEQ ID NO: 28	Cadena pesada variable (VH) de: huAb1v1CDR2v7 Ab101 Ab102 (CDR en negritas)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMN WVRQAPGKGLEWIA YISSGRNIYYADTVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS SWGYFDV WGQGTTVTVSS
35	SEQ ID NO: 29	VH huAb1v1CDR2v8 (CDR en negritas)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMN WVRQAPGKGLEWIA YISSGRINIYYADTVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS SWGYFDV WGQGTTVTVSS
40	SEQ ID NO: 30	Cadena pesada variable (VH) de: huAb1v1CDR2v9 (CDR en negritas)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMN WVRQAPGKGLEWIA YISSGRQNIYYADTVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS SWGYFDV WGQGTTVTVSS
45	SEQ ID NO: 31	Cadena pesada variable (VH) de: huAb1v1CDR2v10 (CDR en negritas)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMN WVRQAPGKGLEWIA YISSGRWNIYYADTVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS SWGYFDV WGQGTTVTVSS
50	SEQ ID NO: 32	Cadena pesada variable (VH) de: huAb1v1CDR2v11 (CDR en negritas)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMN WVRQAPGKGLEWIA YISSGRMNIYYADTVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS SWGYFDV WGQGTTVTVSS

5	SEQ ID NO: 33	Cadena pesada variable (VH) de: huAb1v1CDR2v12 (CDR en negritas)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS SGFTFSDYGMN WVRQAPGKGLEWIA YISSGRKNIYYADTVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS SWG YFDV WGQGTTVTVSS
10	SEQ ID NO: 34	Cadena pesada variable (VH) de: huAb1v1CDR2v13 (CDR en negritas)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS SGFTFSDYGMN WVRQAPGKGLEWIA YISSGRHNIYYADTVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS SWG YFDV WGQGTTVTVSS
15	SEQ ID NO: 35	Cadena pesada variable (VH) de: huAb1v1CDR2v14 (CDR en negritas)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS SGFTFSDYGMN WVRQAPGKGLEWIA YISSGRFNIYYADTVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS SWG YFDV WGQGTTVTVSS
20	SEQ ID NO: 36	Cadena pesada variable (VH) de: huAb1v1CDR2v15 (CDR en negritas)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS SGFTFSDYGMN WVRQAPGKGLEWIA YISSGRYNIYYADTVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS SWG YFDV WGQGTTVTVSS
25	SEQ ID NO: 37	Cadena pesada variable (VH) de: huAb1v1CDR2v16 (CDR en negritas)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS SGFTFSDYGMN WVRQAPGKGLEWIA YISSGRANIYYADTVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS SWG YFDV WGQGTTVTVSS
30	SEQ ID NO: 38	Cadena pesada variable (VH) de: huAb1v1CDR2v17 (CDR en negritas)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS SGFTFSDYGMN WVRQAPGKGLEWIA YISSGRPNIIYYADTVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS SWG YFDV WGQGTTVTVSS
35	SEQ ID NO: 39	Secuencia de la cadena pesada Ab101 (la región constante está subrayada; CDR en negritas)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS SGFTFSDYGMN WVRQAPGKGLEWIA YISSGRGNIYYADTVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS SWG YFDV WGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA <u>LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS</u> <u>SGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV</u> <u>DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK</u> <u>PKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDG</u> <u>VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG</u> <u>KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL</u> <u>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ</u> <u>PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN</u> <u>VFSCSVMHIALHNHYTQKSLSLSPGK</u>

5	SEQ ID NO: 40	Secuencia de la cadena ligera Ab101 Secuencia de la cadena ligera Ab102 Humanizado (la región constante está subrayada; CDR en negritas)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNRGNQ KNYLT WFFQKPGQPPKLLI YWASTRES GVDPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYC QNDYTYPLTFG QGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC <u>LLNNFY</u> <u>PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK</u> <u>DSTYSL</u> <u>SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP</u> <u>VTKSFN</u> <u>RGEC</u>
10			
15	SEQ ID NO: 41	Secuencia de la cadena pesada Ab102 Humanizado (la región constante está subrayada; CDR en negritas)	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAAS GFTFSDYGMN WVRQAPGKGLEWIA YISSGRGNIYYADTVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS WGIFYDV WGQGT TVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA <u>LGCLVKDYFPEP</u> <u>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS</u> <u>SGLYSLSSV</u> <u>TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV</u> <u>DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK</u> <u>PKDQLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDG</u> <u>VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG</u> <u>KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL</u> <u>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ</u> <u>PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN</u> <u>VFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
20			
25	SEQ ID NO: 42	CDR2 de la cadena pesada de: Ab2 huAb1v1CDR2v7 Ab101 Ab102	YISSGRGNIYYADTVKG
30			
35	SEQ ID NO: 43	Cadena ligera variable de: huAb1v6 huAb1v3 (CDR en negritas)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNLGNQ KNYLT WFFQKPGQPPKLLI YWASTRES GVDPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYC QNDYTYPLTFG QGKLEIK
40	SEQ ID NO: 44	Cadena pesada variable de: Ab3 (murino) (CDR en negritas)	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKAF GYTFTSYTMH WVKRPGQGLEWIG YINPSSDYPNYNQKFKDKATL TADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR WGYSFDY WGQGTTLTVSS
45	SEQ ID NO: 45	CDR1 de la cadena pesada de: Ab3 (murino) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1B	GYTFTSYTMH
50			
55			
60			

SEQ ID NO: 46	CDR2 de la cadena pesada de: Ab3 (murino) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1B	YINPSSDYPNYNQKFKD
SEQ ID NO: 47	CDR3 de la cadena pesada de: Ab3 (murino) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1B	WGYSFDY
SEQ ID NO: 48	Cadena ligera variable de: Ab3 (murino) (CDR en negritas)	DIVMTQAAPSVSVIPGESVSISCR SSKSLLHSNGN TYLY WFLQRPQGSPQYLIY RMSTLAS GVDPDRFSGS GSGTAFTLRISRVEAEDVGVIY YCMQHLEYPLTFGA GTKLELK
SEQ ID NO: 49	CDR1 de la cadena ligera de: Ab3 (murino) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A	RSSKSLLHSNGNTYLY
	huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1B	

5	SEQ ID NO: 50	CDR2 de la cadena ligera de: Ab3 (murino) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1B	RMSTLAS
10			
15			
20	SEQ ID NO: 51	CDR3 de la cadena ligera de: Ab3 (murino) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1B	MQHLEYPLT
25			
30			
35	SEQ ID NO: 52	Cadena pesada variable de: huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTSYTMH WVRQAPGQGLEWMGYINPSSDYPNYNQKFKDRVITAD KSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGYSFDY WGQGTTTVTVSS
40			
45	SEQ ID NO: 53	Cadena ligera variable de: huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1 (CDR en negritas)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNHN TYLYWYLQKPGQSPQLLIYRMSTLAS GVDPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQHLEYPLT FGQ GTKLEIK
50	SEQ ID NO: 54	Cadena pesada variable de: huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1B (CDR en negritas)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTSYTMH WVRQAPGQGLEWMGYINPSSDYPNYNQKFKDRVTL TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR WGYSFDY WGQGTTTVTVSS
55			
60	SEQ ID NO: 55	Cadena pesada variable de: huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1B (CDR en negritas)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTSYTMH WVRQAPGQGLEWIGYINPSSDYPNYNQKFKDRATL TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR WGYSFDY WGQGTTTVTVSS

5	SEQ ID NO: 56	Cadena ligera variable de: huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1A (CDR en negritas)	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLLSNGN TYLYWFLQKPGQSPQYLIYRMSTLASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQHLEYPLTFGQ GTKLEIK
10	SEQ ID NO: 57	Cadena ligera variable de: huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1B (CDR en negritas)	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLLSNGN TYLYWFLQKPGQSPQYLIYRMSTLASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQHLEYPLTFGQ GTKLEIK
15	SEQ ID NO: 58	CDR2 de la cadena pesada de: huAb1v1CDR2v1	YISSGRTNIYYADTVKG
20	SEQ ID NO: 59	CDR2 de la cadena pesada de: huAb1v1CDR2v2	YISSGRDNIYYADTVKG
25	SEQ ID NO: 60	CDR2 de la cadena pesada de: huAb1v1CDR2v3	YISSGRENIYYADTVKG
30	SEQ ID NO: 61	CDR2 de la cadena pesada de: huAb1v1CDR2v4	YISSGRNIYYADTVKG
35	SEQ ID NO: 62	CDR2 de la cadena pesada de: huAb1v1CDR2v5	YISSGRVNIYYADTVKG
40	SEQ ID NO: 63	CDR2 de la cadena pesada de: huAb1v1CDR2v6	YISSGRLNIYYADTVKG
45	SEQ ID NO: 64	CDR2 de la cadena pesada de: huAb1v1CDR2v8	YISSGRINIYYADTVKG
50	SEQ ID NO: 65	CDR2 de la cadena pesada de: huAb1v1CDR2v9	YISSGRQNIYYADTVKG
55	SEQ ID NO: 66	CDR2 de la cadena pesada de: huAb1v1CDR2v10	YISSGRWNIYYADTVKG
60	SEQ ID NO: 67	CDR2 de la cadena pesada de: huAb1v1CDR2v11	YISSGRMNIYYADTVKG
65	SEQ ID NO: 68	CDR2 de la cadena pesada de: huAb1v1CDR2v12	YISSGRKNIYYADTVKG
	SEQ ID NO: 69	CDR2 de la cadena pesada de: huAb1v1CDR2v13	YISSGRHNIYYADTVKG
	SEQ ID NO: 70	CDR2 de la cadena pesada de: huAb1v1CDR2v14	YISSGRFNIYYADTVKG
	SEQ ID NO: 71	CDR2 de la cadena pesada de: huAb1v1CDR2v15	YISSGRYNIYYADTVKG

5	SEQ ID NO: 72	CDR2 de la cadena pesada de: huAb1v1CDR2v16	YISSGRANIYYADTVKG
	SEQ ID NO: 73	CDR2 de la cadena pesada de: huAb1v1CDR2v17	YISSGRPNIIYADTVKG
10	SEQ ID NO: 74	CDR1 de la cadena ligera de: huAb1v4	KSSQSLLNPGNQKNYLT
15	SEQ ID NO: 75	Cadena pesada variable de: Ab2 (murino) (CDR en negritas)	EVQLVESGGGLVKPGGSLKVSCAAS GFTFSDYGMN WVRQSPKGLEWIA YISSGRGNIYYADTVKGRFTI SRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCAR SWG YFDV WGTGTTVTVSS
20	SEQ ID NO: 76	Cadena ligera variable de: Ab2 (murino) (CDR en negritas)	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCK SQSLLNSGNQ KNYLTW FQQKPGQPPKLLI YWASTRES GVDPDRFTG SGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC QNDYTYPLTFG AGTKLELK
25	SEQ ID NO: 77	Cadena ligera variable de: huAb1v4	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNPGNQ KNYLTW FQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFG QGTKLEIK
30	SEQ ID NO: 78	Secuencia consenso de CDR1 de la cadena pesada variable	G(F/Y)TF(S/T) (D/S)Y(G/T)M(N/H)
35	SEQ ID NO: 79	Secuencia consenso de CDR2 de la cadena pesada variable	YI (S / N) (S / P) (G / S) (R / S) (D / S / G) (N / Y) (I / P) (Y / N) Y (A / N) (D / Q) (T / K) (V / F) K (G / D)
40	SEQ ID NO: 80	Secuencia consenso de CDR3 de la cadena pesada variable	(S / W) (W / G) (G / Y) (Y / S) FDV
45	SEQ ID NO: 81	Región constante de Ig Lambda humana	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG AVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSY LSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
50	SEQ ID NO: 82	Secuencia aceptora de la cadena pesada humana VH1-18&JH6 FR1 21/28&JH4 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
55	SEQ ID NO: 83	Secuencia aceptora de la cadena pesada humana VH1-18&JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
60	Identificad or de secuencia	Proteína	Secuencia
	SEQ ID NO: 84	Secuencia aceptora de la cadena pesada humana VH1-18&JH6 FR3	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR

5	SEQ ID NO: 85	Secuencia aceptora de la cadena pesada humana VH1-18&JH6 FR4 VH2-26&JH6 FR4 VH1-46&JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
10	SEQ ID NO: 86	Secuencia aceptora de la cadena pesada humana 21/28&JH4 FR2	WVRQAPGQRLEWMG
15	SEQ ID NO: 87	Secuencia aceptora de la cadena pesada humana 21/28&JH4 FR3	RVTITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR
20	SEQ ID NO: 88	Secuencia aceptora de la cadena pesada humana 21/28&JH4 FR4 M60&JH4 FR4	WGQGTTLVTVSS
25	SEQ ID NO: 89	Secuencia aceptora de la cadena pesada humana VH2-26&JH6 FR1	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLS
30	SEQ ID NO: 90	Secuencia aceptora de la cadena pesada humana VH2-26&JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLAH
35	SEQ ID NO: 91	Secuencia aceptora de la cadena pesada humana VH2-26&JH6 FR3	RLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATYYCAR
40	SEQ ID NO: 92	Secuencia aceptora de la cadena pesada humana M60&JH4 FR1	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTLYGFSLS
45	SEQ ID NO: 93	Secuencia aceptora de la cadena pesada humana M60&JH4 FR2	WIRQPPGKALEWLA
50	SEQ ID NO: 94	Secuencia aceptora de la cadena pesada humana M60&JH4 FR3	RLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCAR
55	SEQ ID NO: 95	Secuencia aceptora de la cadena pesada humana VH1-46&JH6 FR3	RVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCAR
60	SEQ ID NO: 96	Secuencia aceptora de la cadena ligera humana A20&JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC
65	SEQ ID NO: 97	Secuencia aceptora de la cadena ligera humana A20&JK4 FR2	WYQQKPGKVPKLLIY

5	SEQ ID NO: 98	Secuencia aceptora de la cadena ligera humana A20&JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYC
10	SEQ ID NO: 99	Secuencia aceptora de la cadena ligera humana A20&JK4 FR4 III-3R&JK4 FR4 A1&JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
15	SEQ ID NO: 100	Secuencia aceptora de la cadena ligera humana III-3R&JK4 FR3	GVPSRISGSGSGTDFTFTISLQPEDVATYYC
20	SEQ ID NO: 101	Secuencia aceptora de la cadena ligera humana A1&JK4 FR1	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC
25	SEQ ID NO: 102	Secuencia aceptora de la cadena ligera humana A1&JK4 FR2	WFQQRPGQSPRRLIY
30	SEQ ID NO: 103	Secuencia aceptora de la cadena ligera humana A1&JK4 FR3 01&JK2 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
35	SEQ ID NO: 104	Secuencia aceptora de la cadena ligera humana 01&JK2 FR1	DIVMTQTPLSLPVTGPGEASISC
40	SEQ ID NO: 105	Secuencia aceptora de la cadena ligera humana 01&JK2 FR2	WYLQKPGQSPQLLIY
45	SEQ ID NO: 106	Secuencia aceptora de la cadena ligera humana 01&JK2 FR4	FGQGTKLEIKR
50	SEQ ID NO: 107	Dominio extracelular de CD40 humano	EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVS DCTEFT ETECLPCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLR VQKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESECV
55	SEQ ID NO: 108	Secuencia consenso de CDR1 de la cadena ligera variable	(K/R)SS(Q/K)SLL(N/H)S(G/-)N(Q/G) (K / N) (N/T)YL(T/Y)
60	SEQ ID NO: 109	Secuencia consenso de CDR2 de la cadena ligera variable	(W/R)(A/M)ST(R/L)(E/A)S
65	SEQ ID NO: 110	Secuencia consenso de CDR3 de la cadena ligera variable	(Q/M) (N/Q) (D/H) (Y/L) (T/E)YPLT
	SEQ ID NO: 111	CDR2 de la cadena pesada	YISSGRXNIYYADTVKG Donde "X" es cualquier aminoácido distinto de T, D, V, L, I, M
	SEQ ID NO: 112	CDR2 de la cadena pesada	YISSGRXNIYYADTVKG Donde "X" es cualquier aminoácido

5	SEQ ID NO: 113	CDR1 de la cadena ligera	KSSQSLNXGNQKNYLT donde "X" no es un residuo de aminoácido Pro
	SEQ ID NO: 114	Secuencia aceptora de la cadena ligera humana III-3R&JK4 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
10	SEQ ID NO: 115	Etiqueta de histidina	His His His His His His

15 Listado de secuencias

<110> ABBVIE, INC.

<120> ANTICUERPOS ANTI-CD40 Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 117813-10420

20

<140>

<141>

<150> 62/168,425

25

<151> 2015-05-29

<160> 117

<170> PatentIn versión 3.5

30

<210> 1

<211> 277

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35

<400> 1

40

45

50

55

60

65

ES 2 774 016 T3

	Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr	
	1 5 10 15	
5	Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu	
	20 25 30	
10	Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val	
	35 40 45	
15	Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu	
	50 55 60	
20	Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His	
	65 70 75 80	
25	Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr	
	85 90 95	
30	Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr	
	100 105 110	
35	Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly	
	115 120 125	
40	Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu	
	130 135 140	
45	Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys	
	145 150 155 160	
50	Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln	
	165 170 175	
55	Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu	
	180 185 190	
60	Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile	
	195 200 205	
65	Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn	
	210 215 220	
70	Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp	
	225 230 235 240	
75	Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His	
	245 250 255	
80	Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser	
	260 265 270	
85	Val Gln Glu Arg Gln	
	275	

ES 2 774 016 T3

<210> 2
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

40

45

50

55

60

65

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

ES 2 774 016 T3

	Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys	100	105	110
5	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro	115	120	125
10	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys	130	135	140
15	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	145	150	155
20	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	165	170	175
25	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu	180	185	190
30	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	195	200	205
35	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	210	215	220
40	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu	225	230	235
45	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	245	250	255
50	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn	260	265	270
55	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe	275	280	285
60	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn	290	295	300
65	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr	305	310	315
	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	325	330	

<210> 3

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 774 016 T3

	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	
	1				5					10					15		
5	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	
				20					25					30			
10	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
			35					40					45				
15	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
	50						55						60				
20	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	
	65					70					75					80	
25	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
				85						90					95		
30	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	
				100					105					110			
35	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
				115				120					125				
40	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
	130						135					140					
45	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
	145					150					155					160	
50	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
				165						170					175		
55	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
				180				185						190			
60	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
			195					200					205				
65	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
	210						215					220					
70	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	
	225					230					235					240	

ES 2 774 016 T3

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

5 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

10 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

15 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

20 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

25
<210> 4
<211> 106
<212> PRT
30 <213> Homo sapiens

<400> 4

35 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

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

45 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

50 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

55 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

60 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

65 <210> 5
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

ES 2 774 016 T3

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

5 <400> 5

```

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

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

15    Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile
        35           40           45

20    Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Ser Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
        50           55           60

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

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

30    Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val
        100          105          110

35    Thr Val Ser Ser
        115
  
```

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 6

```

    Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Met Asn
    1           5           10
  
```

<210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial:Péptido sintético"

<400> 7

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Ser Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15
 5 Gly
 <210> 8
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 15 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 8
 20 Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val
 1 5
 <210> 9
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 9
 35 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 40 Glu Met Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 45 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 50 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 55 Pro Asp Arg Phe Ala Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 60 Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 65 Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys
 65

<210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 10 <400> 10

 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15
 15
 Thr
 20
 <210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 30 <400> 11

 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 40 <400> 12

 Gln Asn Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr
 1 5
 45
 <210> 13
 <211> 116
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 55 <400> 13

 60

 65

ES 2 774 016 T3

	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	
	1				5					10					15		
5	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr	
				20					25					30			
10	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			35					40					45				
15	Ser	Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Arg	Ser	Asn	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Thr	Val	
	50						55					60					
20	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	
	65					70					75					80	
25	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
30	Ala	Arg	Ser	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	
				100					105					110			
35	Thr	Val	Ser	Ser													
				115													
40	<210> 14																
	<211> 113																
	<212> PRT																
	<213> Secuencia Artificial																
45	<220>																
	<221> fuente																
	<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"																
50	<400> 14																

ES 2 774 016 T3

	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
	1 5 10 15
5	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
	20 25 30
10	Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
	35 40 45
15	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
	50 55 60
20	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
	65 70 75 80
25	Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
	85 90 95
30	Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
	100 105 110
35	Lys
40	<210> 15
45	<211> 116
	<212> PRT
	<213> Secuencia Artificial
50	<220>
55	<221> fuente
	<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
60	<400> 15
65	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
	1 5 10 15
70	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
	20 25 30
75	Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
	35 40 45
80	Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Ser Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
	50 55 60
85	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
	65 70 75 80
90	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
	85 90 95
95	Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
	100 105 110
100	Thr Val Ser Ser
	115

<210> 16
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 10 <400> 16

 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 20
 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 25
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 30
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 35
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 40
 Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 45
 Lys
 50
 <210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 60
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Leu Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15
 65
 Thr
 65
 <210> 18
 <211> 113

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 5 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 18

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

15 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Thr
 20 25 30

20 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

25 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

30 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

35 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95

40 Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

40 <210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 19

50 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Thr Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

55 Thr

60 <210> 20
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

ES 2 774 016 T3

<400> 20

```

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

      Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Arg
      20          25          30

10     Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
      35          40          45

15     Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
      50          55          60

20     Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
      65          70          75          80

      Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
      85          90          95

25     Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
      100         105         110

30     Lys

```

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 21

```

45     Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Arg Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
      1          5          10          15

      Thr

```

50

<210> 22

<211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

55

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

60

<400> 22

65

ES 2 774 016 T3

1 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 10 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 15 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Thr Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 20 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 25 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 30 Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 35 Thr Val Ser Ser
 <210> 23
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 23
 45 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 50 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 55 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 60 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Asp Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 65 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

ES 2 774 016 T3

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

5

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

10

Thr Val Ser Ser
 115

15

<210> 24
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

60

Thr Val Ser Ser
 115

65

<210> 25
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 25

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 26

<211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 26

ES 2 774 016 T3

	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly	1 5 10 15
5	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr	20 25 30
10	Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile	35 40 45
	Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Val Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val	50 55 60
15	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr	65 70 75 80
20	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85 90 95
	Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val	100 105 110
25	Thr Val Ser Ser	115
30	<210> 27 <211> 116 <212> PRT <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"	
40	<400> 27	
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly	1 5 10 15
45	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr	20 25 30
	Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile	35 40 45
50	Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Leu Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val	50 55 60
55	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr	65 70 75 80
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85 90 95
60	Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val	100 105 110
65	Thr Val Ser Ser	115

<210> 28
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

10

<400> 28

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 29
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

50

<400> 29

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

55

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

60

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

65

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Ile Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val

ES 2 774 016 T3

	50		55		60	
5	Lys Gly Arg Phe Thr	Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr				
	65	70	75	80		
10	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
		85	90	95		
15	Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val					
		100	105	110		
20	Thr Val Ser Ser					
		115				
<210> 30						
<211> 116						
<212> PRT						
<213> Secuencia Artificial						
<220>						
<221> fuente						
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"						
<400> 30						
30	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly					
	1	5	10	15		
35	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr					
		20	25	30		
40	Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile					
		35	40	45		
45	Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Gln Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val					
		50	55	60		
50	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr					
	65	70	75	80		
55	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
		85	90	95		
60	Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val					
		100	105	110		
65	Thr Val Ser Ser					
		115				

<210> 31
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 10 <400> 31

 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 15 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 20 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 25 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Trp Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 30 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 35 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 40 Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110
 45 Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 32
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 50 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 32
 55
 60
 65

ES 2 774 016 T3

1 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 10 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 15 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Met Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 20 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 25 Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 Thr Val Ser Ser

<210> 33
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 33

40 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 45 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 50 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 55 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Lys Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 60 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 65 Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 Thr Val Ser Ser

<210> 34
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 10 <400> 34

 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 15 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 20 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 25 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg His Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 30 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 35 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 40 Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110
 45 Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 35
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 50 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 35

 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 55 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 60 20 25 30
 65

ES 2 774 016 T3

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 5
 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Phe Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 10
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 15
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 20
 Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110
 25
 Thr Val Ser Ser
 115
 30
 <210> 36
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 40
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 45
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 50
 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Tyr Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 55
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 60
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 65
 Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

<210> 37
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

10

<400> 37

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

40

Thr Val Ser Ser
 115

45

<210> 38
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

55

<400> 38

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

60

65

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

5

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

10

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

15

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

20

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

25

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

30

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 39
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

40

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

45

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

50

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

55

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

60

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

65

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

	Ala	Arg	Ser	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	
				100					105					110			
5	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	
			115					120					125				
10	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	
		130					135					140					
15	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	
	145					150					155					160	
20	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	
					165					170					175		
25	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	
				180					185					190			
30	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	
			195					200					205				
35	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	
		210					215					220					
40	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
	225					230					235					240	
45	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	
					245					250					255		
50	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	
				260					265					270			
55	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	
			275					280					285				
60	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	
		290					295					300					
65	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	
	305					310					315					320	
70	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	
					325					330					335		
75	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	
			340						345					350			

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

5

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

10

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

15

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

20

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

25

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

<210> 40
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

35

<400> 40

40

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

45

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Arg
 20 25 30

50

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

55

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

60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

65

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

ES 2 774 016 T3

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

5

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

<210> 41
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

40

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

45

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

50

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

55

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

60

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

65

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

ES 2 774 016 T3

	Ala	Arg	Ser	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	
				100					105					110			
5	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	
			115					120					125				
10	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	
		130					135					140					
15	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	
	145					150					155					160	
20	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	
					165					170					175		
25	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	
				180					185					190			
30	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	
			195					200					205				
35	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	
		210					215					220					
40	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
	225					230					235					240	
45	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Gln	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	
					245					250					255		
50	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	
				260					265					270			
55	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	
			275					280					285				
60	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	
		290					295					300					
65	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	
	305					310					315					320	
70	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	
					325					330					335		
75	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	
				340					345					350			

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 5
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 10
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 15
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 20
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 25
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 42
 <211> 17
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 35 <400> 42
 Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Gly Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15
 40
 Gly
 45 <210> 43
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 43
 55
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 60
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Leu
 20 25 30
 65

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

5 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

10 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

15 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95

20 Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

25 <210> 44
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

35 <400> 44

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

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

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

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

55 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

65 Ala Arg Trp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110

<210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 10 <400> 45
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Thr Met His
 1 5 10
 15
 <210> 46
 <211> 17
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 25 <400> 46
 Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Asp Tyr Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 30
 Asp
 35
 <210> 47
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 45 <400> 47
 Trp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr
 1 5
 50
 <210> 48
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 60 <400> 48
 65

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

 10 Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

 15 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

 20 Pro Gln Tyr Leu Ile Tyr Arg Met Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

 35 Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

35 <210> 49
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 49

45 Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
 1 5 10 15

50 <210> 50
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 50

60 Arg Met Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

65

<210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 10
 <400> 51

 Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr
 1 5
 15
 <210> 52
 <211> 116
 <212> PRT
 20
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 25
 <400> 52

 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 30
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 35
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 40
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Asp Tyr Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 45
 Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 50
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 55
 Ala Arg Trp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110
 60
 Thr Val Ser Ser
 115
 65
 <210> 53
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

5 <400> 53

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

35 <210> 54
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

45 <400> 54

50

55

60

65

ES 2 774 016 T3

1 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 5 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 10 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 15 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Asp Tyr Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 20 Lys Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 25 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 30 Thr Val Ser Ser
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

<210> 55

<211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 55

ES 2 774 016 T3

	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
	1				5					10					15	
5	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
				20				25						30		
10	Thr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
			35					40					45			
15	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Ser	Asp	Tyr	Pro	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50						55					60				
20	Lys	Asp	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65					70					75					80
25	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
30	Ala	Arg	Trp	Gly	Tyr	Ser	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val
				100					105					110		
	Thr	Val	Ser	Ser												
				115												
35	<210> 56															
	<211> 112															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia Artificial															
40	<220>															
	<221> fuente															
	<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"															
45	<400> 56															
50																
55																
60																
65																

ES 2 774 016 T3

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

5 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

10 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

15 Pro Gln Tyr Leu Ile Tyr Arg Met Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

30 Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

30 <210> 57
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

40 <400> 57

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

45 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

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

55 Pro Gln Tyr Leu Ile Tyr Arg Met Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

5
<210> 58
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
10
<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

15 <400> 58

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Thr Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

20
Gly

25
<210> 59
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
30
<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
<400> 59

35 Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Asp Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

40 Gly

<210> 60
<211> 17
45 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
50 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
<400> 60

55 Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

60 Gly

<210> 61
<211> 17
<212> PRT
65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

5 <400> 61

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

10

Gly

15 <210> 62
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

25 <400> 62

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Val Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

30

Gly

35 <210> 63
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 63

45 Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Leu Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

50

Gly

55 <210> 64
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 64

65

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Ile Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

5 Gly

<210> 65
 <211> 17
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 15 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 65

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Gln Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

25 Gly

<210> 66
 <211> 17
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

35 <400> 66

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

45 Gly

<210> 67
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

55 <400> 67

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Met Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

65 Gly

<210> 68
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

10

<400> 68

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Lys Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

15

Gly

20

<210> 69
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

30

<400> 69

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

35

Gly

40

<210> 70
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

50

<400> 70

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Phe Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

55

Gly

60

<210> 71
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

65

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 71

5 Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Tyr Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

10

<210> 72

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

20

<400> 72

25 Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Ala Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

30 <210> 73

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 73

40 Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Pro Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

45 Gly

<210> 74

<211> 17

50 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

55 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 74

60 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Pro Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

65

<210> 75
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 10 <400> 75

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

<210> 76
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <221> fuente
 50 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 76
 55
 60
 65

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

Lys

35 <210> 77
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 77

```

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

      Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Pro
      20          25          30

50

      Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
      35          40          45

55

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

```

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

5 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

10 Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

15 Lys

<210> 78
<211> 10
<212> PRT
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Secuencia sintética consenso"

25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(2)
<223> /reemplazar="Tyr"

30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar="Thr"

35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> /reemplazar="Ser"

40 <220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> /reemplazar="Thr"

45 <220>
<221> VARIANTE
<222> (10)..(10)
<223> /reemplazar="His"

50 <400> 78

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Met Asn
1 5 10

55

<210> 79
<211> 17
60 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
65 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Secuencia sintética consenso"

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> /reemplazar="Asn"
 10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> /reemplazar="Pro"
 15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(6)
 <223> /reemplazar="Ser"
 20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> /reemplazar="Ser" o "Gly"
 25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 <223> /reemplazar="Tyr"
 30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 <223> /reemplazar="Pro"
 35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)..(10)
 <223> /reemplazar="Asn"
 40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)..(11)
 <223> /reemplazar="Asn"
 45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (12)..(12)
 <223> /reemplazar="Gln"
 50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (13)..(13)
 <223> /reemplazar="Lys"
 55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (14)..(14)
 <223> /reemplazar="Phe"
 60 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (15)..(15)
 <223> /reemplazar="Asp"
 65 <400> 79

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Asp Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

5

Gly

10 <210> 80
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Secuencia sintética consenso"

20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> /reemplazar="Trp"

25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(2)
<223> /reemplazar="Gly"

30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> /reemplazar="Tyr"

35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /reemplazar="Ser"

<400> 80

40

Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val
1 5

45 <210> 81
<211> 105
<212> PRT
<213> Homo sapiens

50 <400> 81

55

60

65

ES 2 774 016 T3

1 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 5 1 5 10 15
 5 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 20 25 30
 10 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 35 40 45
 15 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 50 55 60
 20 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 65 70 75 80
 25 His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 85 90 95
 30 Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105
 <210> 82
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 82
 40 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 45 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 50 <210> 83
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 83
 55 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10
 60 <210> 84
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 84
 65

ES 2 774 016 T3

Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

5 Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

10 <210> 85
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 85

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

20

- <210> 86
- <211> 14
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 86

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

30

<210> 87
<211> 32
<212> PRT

35

<213> Homo sapiens

<400> 87

40 Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
45 20 25 30

50

<210>	88
<211>	11
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<400>	88

55 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

60 <210> 89
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

65 <400> 89

ES 2 774 016 T3

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

5 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
 20 25 30

<210> 90
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 90

15 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His
 1 5 10 15

20 <210> 91
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 91

30 Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu Thr
 1 5 10 15

35 Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

40 <210> 92
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 92

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

50 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Leu Tyr Gly Phe Ser Leu Ser
 20 25 30

55 <210> 93
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 93

60 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
 1 5 10

65

ES 2 774 016 T3

<210> 94
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 94
 Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
 1 5 10 15
 Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30
 15
 <210> 95
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20
 <400> 95
 Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30
 30
 <210> 96
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 96
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20
 45
 <210> 97
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50
 <400> 97
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15
 55
 <210> 98
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 98
 60
 65

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 5 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 <210> 99
 10 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 99
 15 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10
 20 <210> 100
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 100
 Gly Val Pro Ser Arg Ile Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 30 Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 35 <210> 101
 <211> 23
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 101
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
 20
 50 <210> 102
 <211> 15
 <212> PRT
 55 <213> Homo sapiens
 <400> 102
 Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr
 1 5 10 15
 60 <210> 103
 <211> 32
 65 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 774 016 T3

<400> 103

5 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

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

10 <210> 104
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 104

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

25 <210> 105
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <400> 105

35 Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

40 <210> 106
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 106

45 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

50 <210> 107
<211> 100
<212> PRT
<213> Homo sapiens

55 <400> 107

60

65

[illegible]

30 <210> 108
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Secuencia sintética consenso"

40 <220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> /reemplazar="Arg"

45 <220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /reemplazar="Lys"

50 <220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> /reemplazar="His"

55 <220>
<221> VARIANTE
<222> (10)..(10)
<223> /reemplazar=" "

60 <220>
<221> VARIANTE
<222> (12)..(12)
<223> /reemplazar="Gly"

65 <220>
<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)
 <223> /reemplazar="Asn"

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (14)..(14)
 <223> /reemplazar="Thr"

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (17)..(17)
 <223> /reemplazar="Tyr"

15 <400> 108
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

20 Thr

25 <210> 109
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Secuencia sintética consenso"

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> /reemplazar="Arg"

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 <223> /reemplazar="Met"

45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> /reemplazar="Leu"

50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> /reemplazar="Ala"

<400> 109

55 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

60 <210> 110
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <221> fuente

```

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Secuencia sintética consenso"

<220>
<221> VARIANTE
5 <222> (1)..(1)
   <223> /reemplazar="Met"

<220>
<221> VARIANTE
10 <222> (2)..(2)
   <223> /reemplazar="Gln"

<220>
<221> VARIANTE
15 <222> (3)..(3)
   <223> /reemplazar="His"

<220>
<221> VARIANTE
20 <222> (4)..(4)
   <223> /reemplazar="Leu"

<220>
<221> VARIANTE
25 <222> (5)..(5)
   <223> /reemplazar="Glu"

<400> 110
30
      Gln Asn Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr
      1          5

<210> 111
<211> 17
35 <212> PRT
   <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
40 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
45 <223> Cualquier aminoácido que no sea Thr, Asp, Val, Leu, Ile o Met

<400> 111

50      Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Xaa Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
      1          5          10          15

      Gly

55
<210> 112
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
60
<220>
<221> fuente
   <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

65 <220>
   <221> MOD_RES

```

<222> (7)..(7)
 <223> Cualquier aminoácido
 <400> 112
 5
 Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Xaa Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15
 10
 Gly
 15
 <210> 113
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 25
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Any amino acid other than Pro
 <400> 113
 30
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Xaa Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15
 35
 Thr
 40
 <210> 114
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 114
 45
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15
 50
 <210> 115
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Etiqueta sintética 6xHis tag"
 <400> 115
 60
 His His His His His His
 1 5
 65
 <210> 116
 <211> 113
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 5 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Secuencia sintética consenso"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (18)..(18)
 10 <223> /reemplazar="Met" o "Lys"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (24)..(24)
 15 <223> /reemplazar="Arg"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (27)..(27)
 20 <223> /reemplazar="Lys"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (31)..(31)
 25 <223> /reemplazar="His"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (33)..(33)
 30 <223> /reemplazar=" "

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (35)..(35)
 35 <223> /reemplazar="Gly"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (36)..(36)
 40 <223> /reemplazar="Asn"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (37)..(37)
 45 <223> /reemplazar="Thr"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (40)..(40)
 50 <223> /reemplazar="Tyr"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (56)..(56)
 55 <223> /reemplazar="Arg"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (57)..(57)
 60 <223> /reemplazar="Met"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (60)..(60)
 65 <223> /reemplazar="Leu"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (61)..(61)
 <223> /reemplazar="Ala"
 5
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (95)..(95)
 <223> /reemplazar="Met"
 10
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (96)..(96)
 <223> /reemplazar="Gln"
 15
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (97)..(97)
 <223> /reemplazar="His"
 20
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (98)..(98)
 <223> /reemplazar="Leu"
 25
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (99)..(99)
 <223> /reemplazar="Glu"
 30
 <400> 116

 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 35
 Glu Ser Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 40
 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 50
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 55
 Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 60
 Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110
 65
 Lys
 <210> 117
 <211> 116

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Secuencia sintética consenso"

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (27)..(27)
 <223> /reemplazar="Tyr"

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (30)..(30)
 <223> /reemplazar="Thr"

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (31)..(31)
 <223> /reemplazar="Ser"

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (33)..(33)
 <223> /reemplazar="Thr"

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (35)..(35)
 <223> /reemplazar="His"

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (52)..(52)
 <223> /reemplazar="Asn"

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (53)..(53)
 <223> /reemplazar="Pro"

45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (54)..(54)
 <223> /reemplazar="Ser"

50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (55)..(55)
 <223> /reemplazar="Ser"

55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (56)..(56)
 <223> /reemplazar="Ser" o "Gly"

60 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (57)..(57)
 <223> /reemplazar="Tyr"

65 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (58)..(58)
 <223> /reemplazar="Pro"

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (59)..(59)
 <223> /reemplazar="Asn"
 10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (61)..(61)
 <223> /reemplazar="Asn"
 15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (62)..(62)
 <223> /reemplazar="Gln"
 20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (63)..(63)
 <223> /reemplazar="Lys"
 25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (64)..(64)
 <223> /reemplazar="Phe"
 30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (66)..(66)
 <223> /reemplazar="Asp"
 35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (99)..(99)
 <223> /reemplazar="Trp"
 40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (100)..(100)
 <223> /reemplazar="Gly"
 45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (101)..(101)
 <223> /reemplazar="Tyr"
 50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (102)..(102)
 <223> /reemplazar="Ser"
 55 <400> 117
 60
 65

ES 2 774 016 T3

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo anti-CD40 que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 41, y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 40.
2. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-CD40 de la reivindicación 1, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 10 3. Un ácido nucleico aislado que codifica las secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-CD40 de la reivindicación 1.
4. Un vector que comprende un ácido nucleico aislado de la reivindicación 3.
- 15 5. Una célula huésped que comprende un vector de la reivindicación 4.
6. La célula huésped de la reivindicación 5, en donde la célula huésped es una célula procariota o una célula eucariota.
- 20 7. La célula huésped de la reivindicación 6, en donde la célula huésped es una célula CHO o una célula COS.
8. Un método para producir el anticuerpo anti-CD40 de la reivindicación 1, el método que comprende las etapas de cultivar una célula huésped de cualquiera de las reivindicaciones 5-7 en medio de cultivo en condiciones
25 suficientes para producir el anticuerpo anti-CD40.
- 30
- 35
- 40

FIGURA 1A

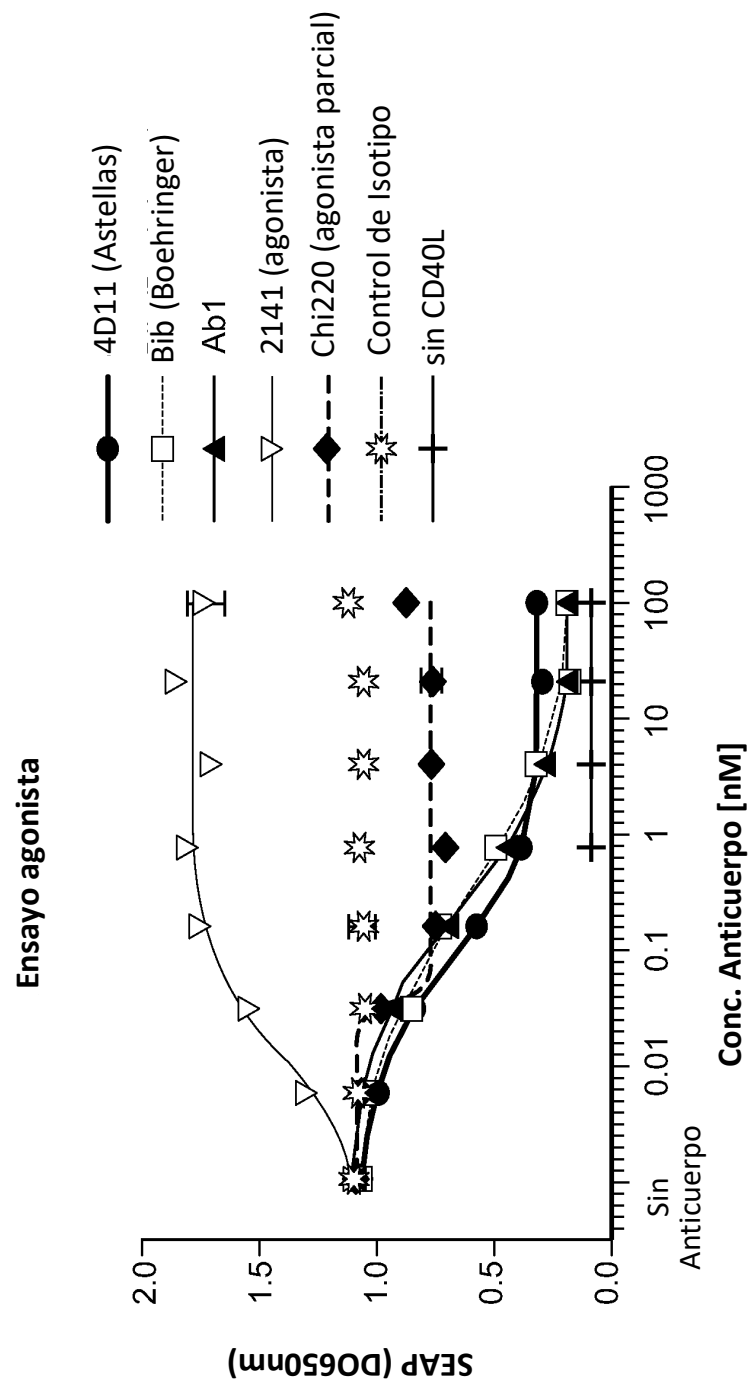


FIGURA 1B

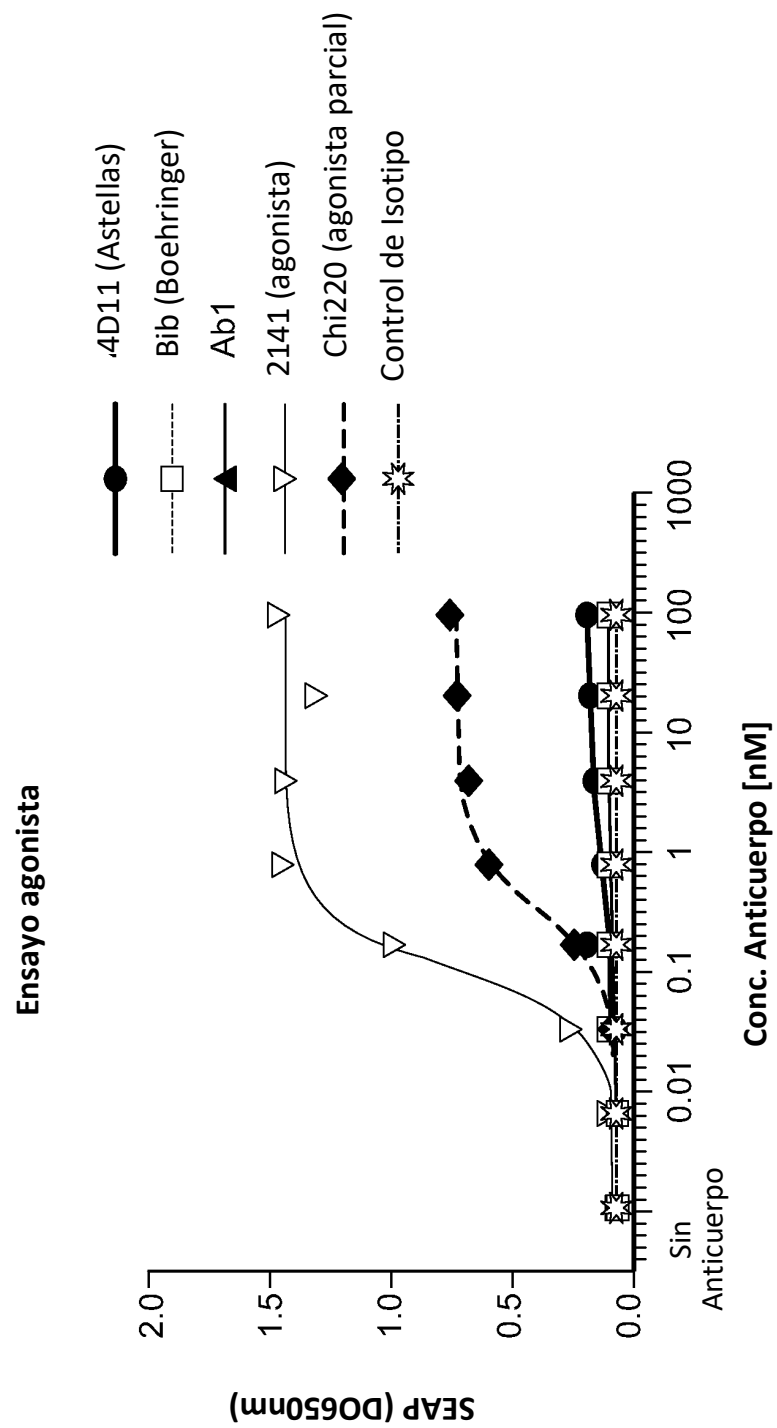


FIGURA 2A

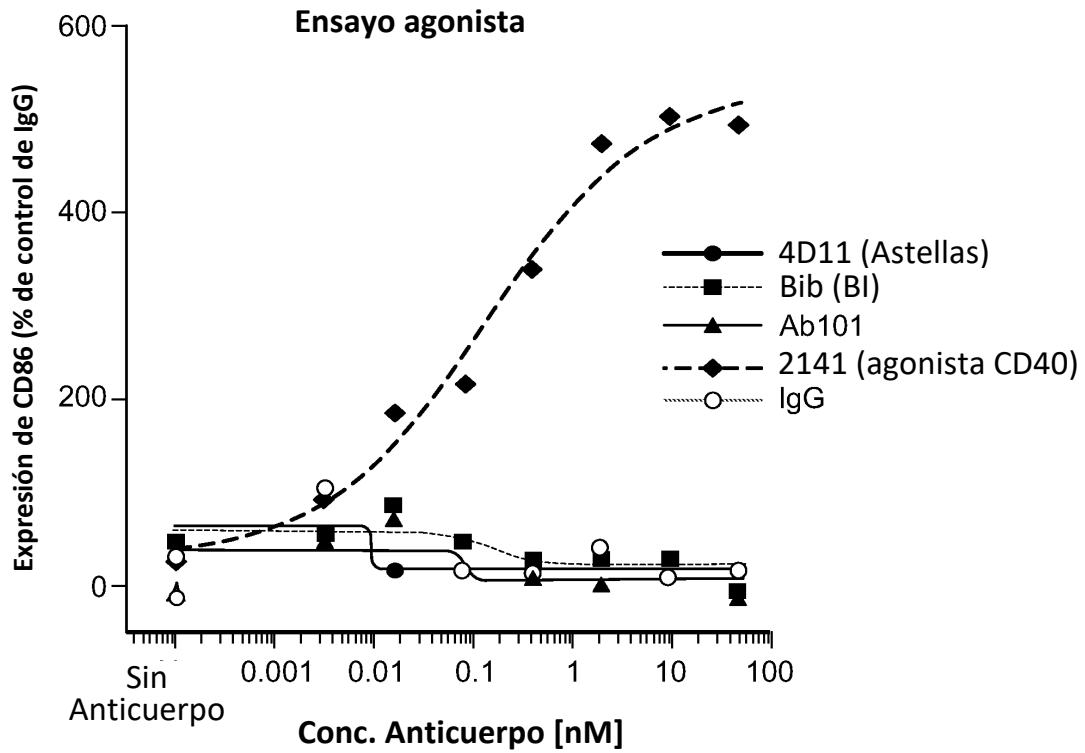


FIGURA 2B

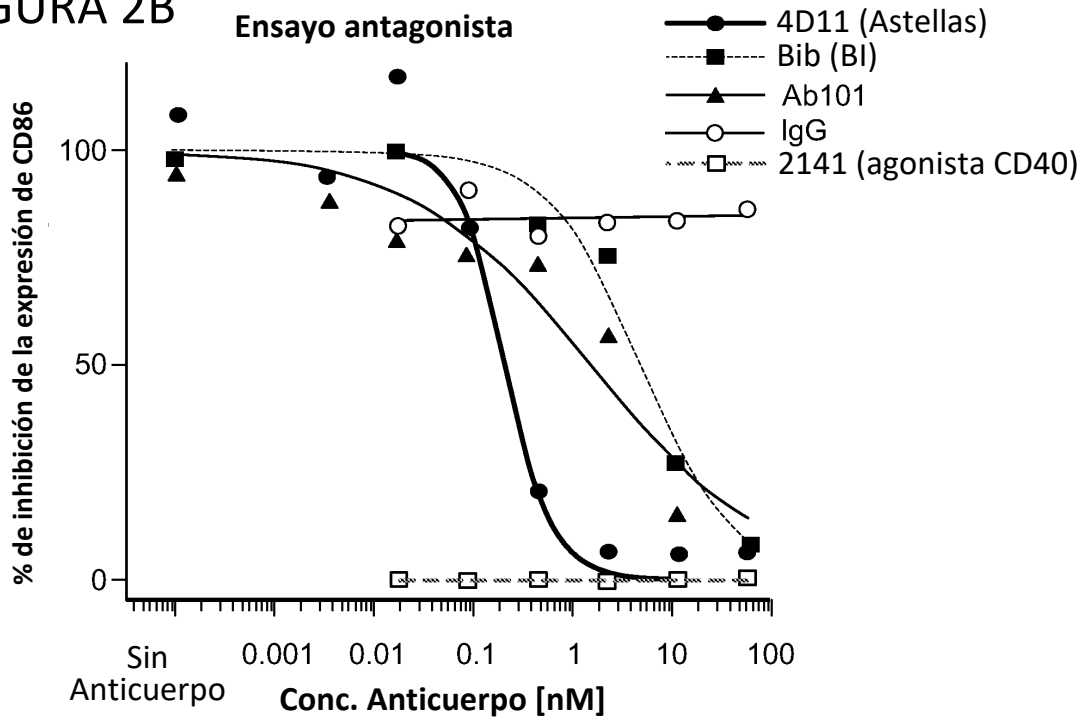


FIGURA 3A

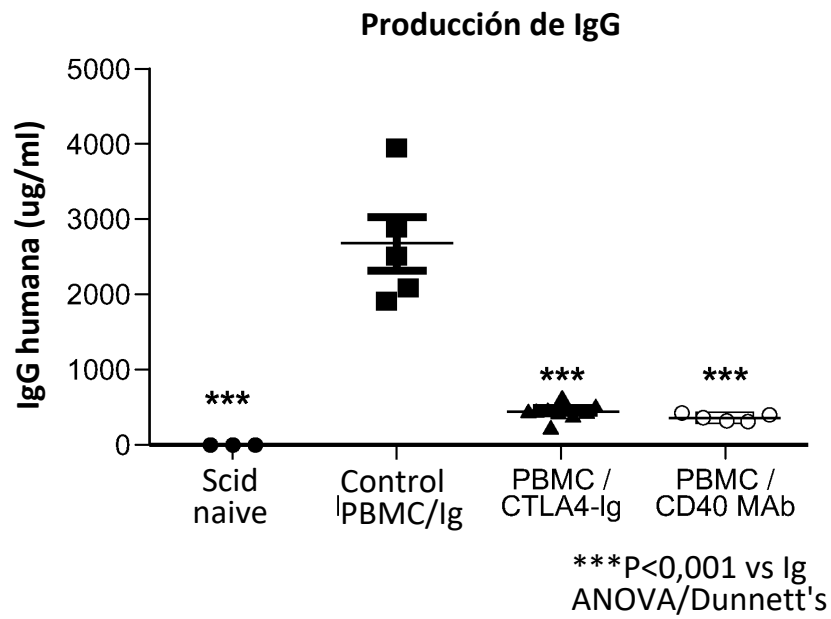


FIGURA 3B

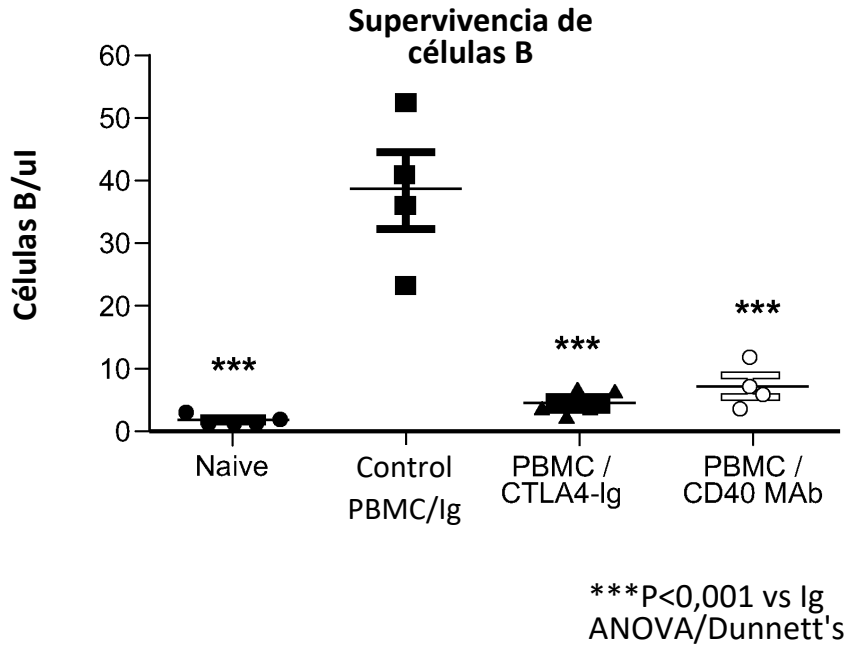


FIGURA 4A

Ab3	SEQ ID NO : 48	(1)	DIVMTQAAPSVSVIPGESVSISCSRSSKSLHS-NGNTYLYWFLQRPQGSP	1	50
Ab1	SEQ ID NO : 9	(1)	DIVMTQSPSSLTVTAGEMVTMSC KSSQ SLLSNGNQKNYLTWFQQKPGQPP		
Ab2	SEQ ID NO : 76	(1)	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSC KSSQ SLLSNGNQKNYLTWFQQKPGQPP		
	Consenso	(1)	DIVMTQSPSSLTVTAGE VTMSC KSSQ SLLSNGNQKNYLTWFQQKPGQPP		
			R K H - GNT Y		
Ab3		51	QYLIY RMSTLAS GVDPDRFSGSGGTFTLRISRVEAEDVGVYYC MQHLEY	51	100
Ab1		(50)	QYLIY RMSTLAS GVDPDRFSGSGGTFTLRISRVEAEDVGVYYC MQHLEY		
Ab2		(51)	KLIIYW ASTRES GVDPDRFAGSGGTFTLTISSVQAEDLAVYYC QNDYTY		
	Consenso	(51)	KLIIYW ASTRES GVDPDRFTGSGGTFTLTISSVQAEDLAVYYC QNDYTY		
		(51)	KLIIYW ASTRES GVDPDRFSGSGGTFTLTISSVQAEDLAVYYC QNDYTY		
			RM LA		
Ab3		101	PLT FGAGTKLEIK	101	
Ab1		(100)	PLT FGAGTKLEIK		
Ab2		(101)	PLT FGAGTKLEIK		
	Consenso	(101)	PLT FGAGTKLEIK		

FIGURA 4B

Ab3	SEQ ID NO : 44 (100)	1	QVQLQQSGAEELARPGASVKMSCKAF	50
Ab1	SEQ ID NO : 5 (101)		GYTFTSYTMHWVKQRPQGLEWIGY	
Ab2	SEQ ID NO : 75 (101)		GFTFSDYGMNWWVRQAPEKGLEWIA	
	Consenso		GFTFSDYGMNWWVRQSPKGLEWIA	
			Y TS T H	
Ab3		51	INPSSDYPNYNQKF	100
Ab1	(150)		KD KATLTADKSSSTAYMQLSLTSEDSAVYYCAR	WG
Ab2	(151)		ISSGRSNIYYADTVKGRFTISRDN	SW
	(151)		AKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCAR	
	(151)		ISSGRGNIYYADTVKGRFTISRDN	SW
	(151)		AKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCAR	
	Consenso		ISSGR NIYYADTVKGRFTISRDN	SW
			AKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCAR	
			NPSS YPN NQKF D	WG
Ab3		101	YSFDYWGQGTTLTVSS	
Ab1	(200)		YSFDYWGQGTTLTVSS	
Ab2	(201)		GYFDVWGTGTTVTVSS	
	(201)		GYFDVWGTGTTVTVSS	
	(201)		GYFDVWGTGTTVTVSS	
	Consenso		GYFDVWGTGTTVTVSS	
			YS	

FIGURA 5A

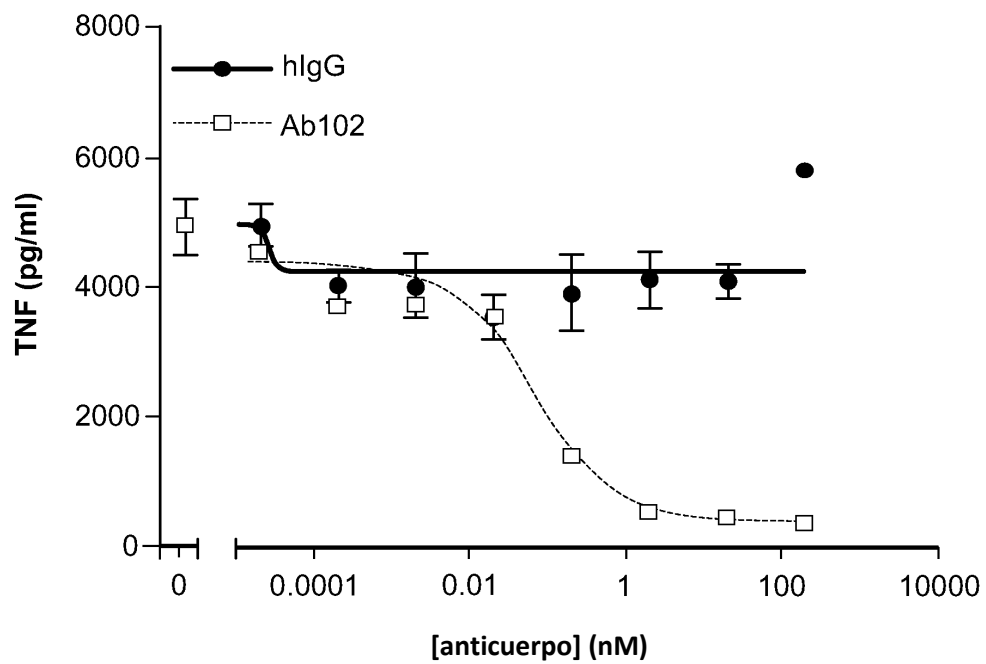


FIGURA 5B

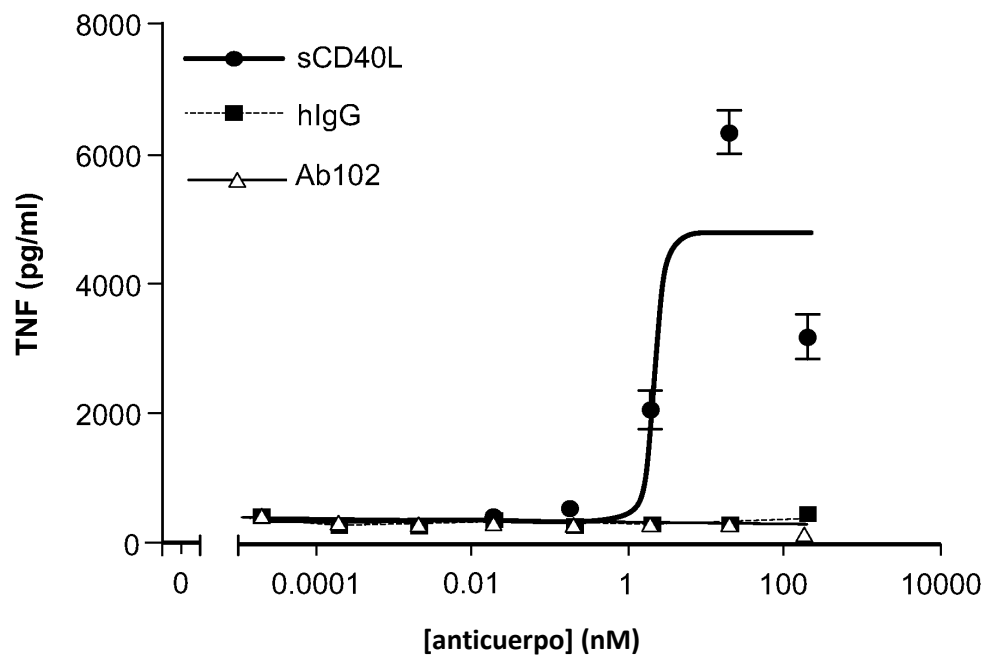


FIGURA 6

**Respuesta profiláctica a la dosis de CD40 Mab en TCT
Día 39 Puntuje final**

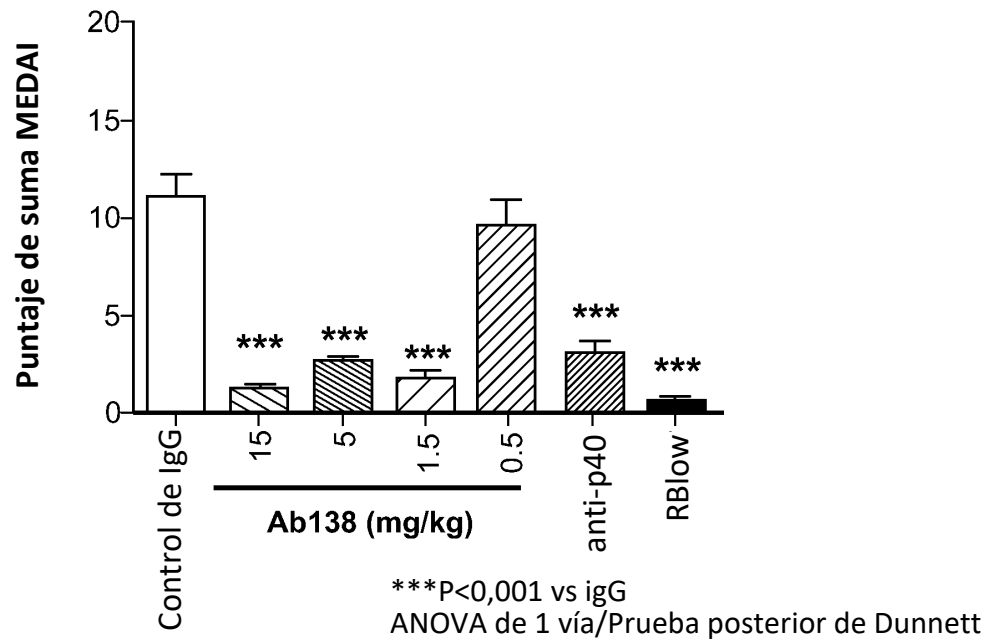


FIGURA 7

**Histología TCT-3012
Macrófagos IBA1⁺ en colon**

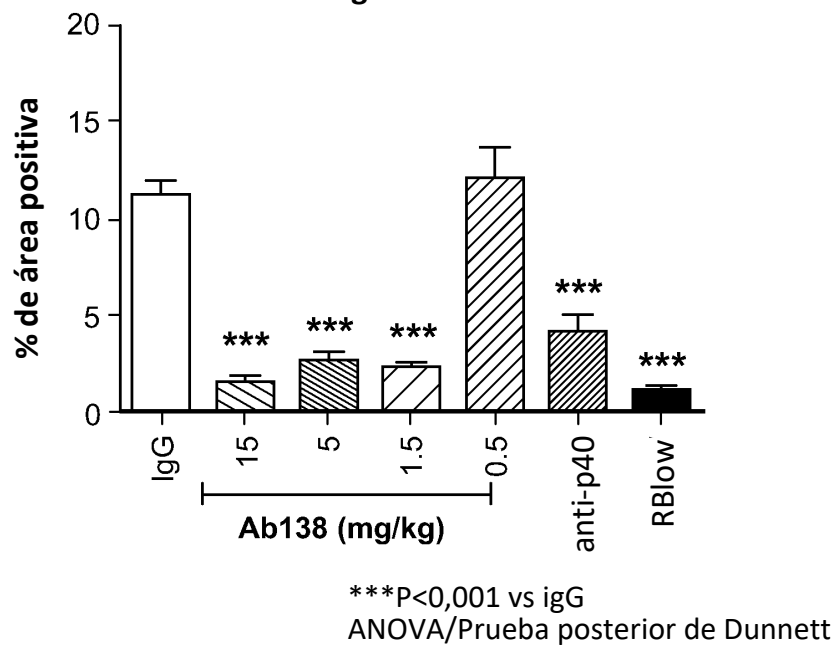
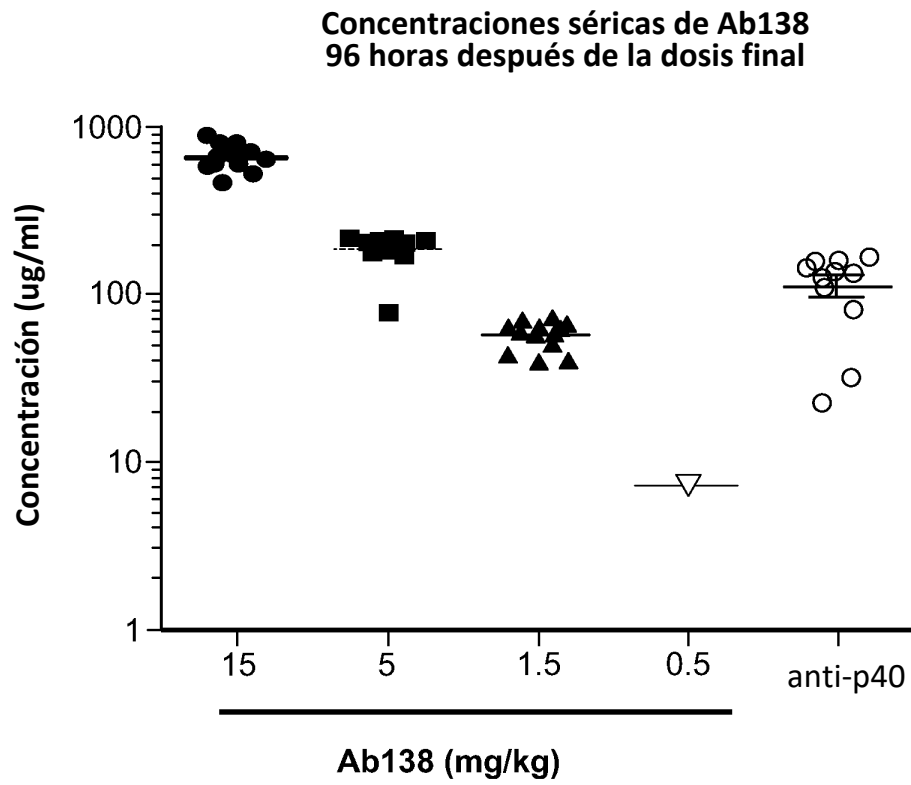


FIGURA 8



solo 1 animal en el grupo de 0,5 mg/kg
tuvo niveles medibles de Ab138

FIGURA 9A

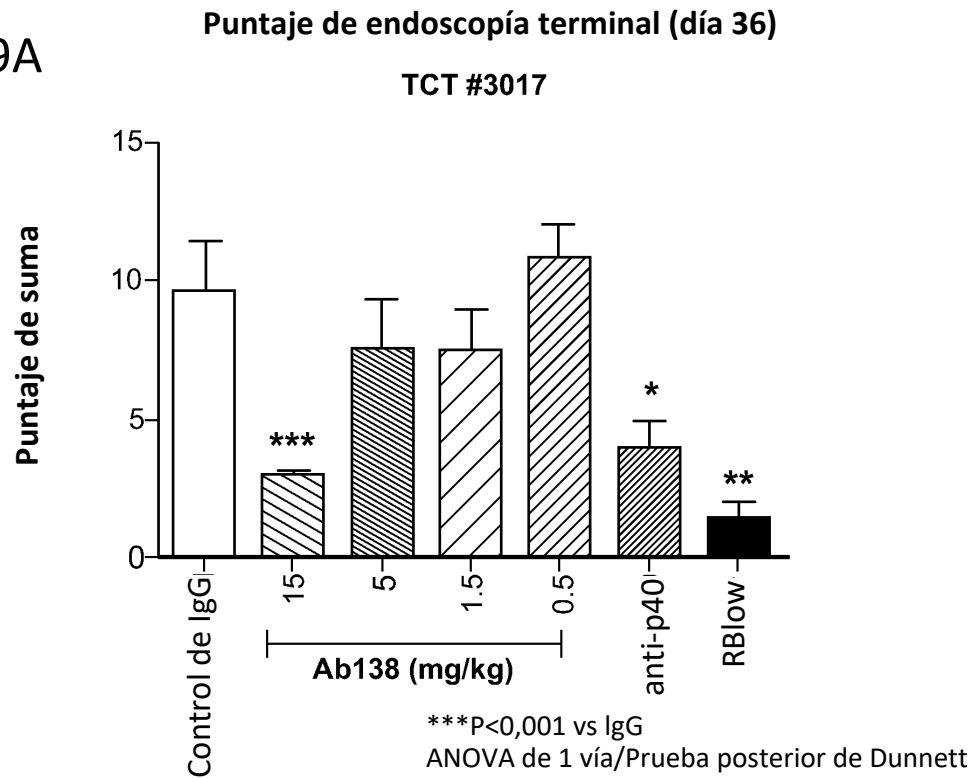


FIGURA 9B

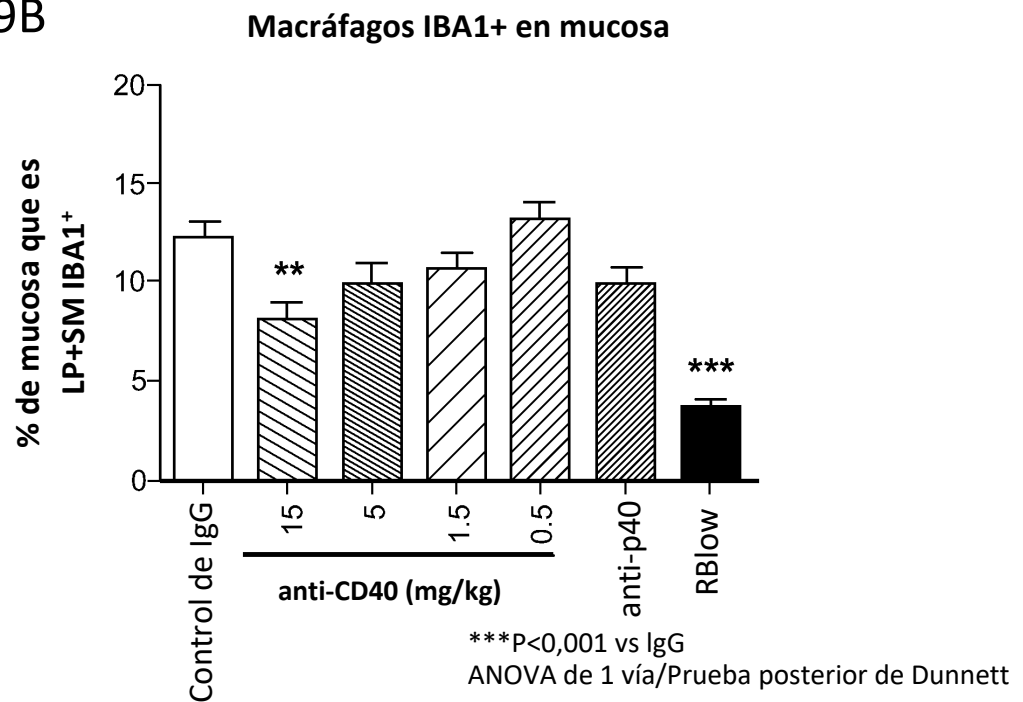


FIGURA 10

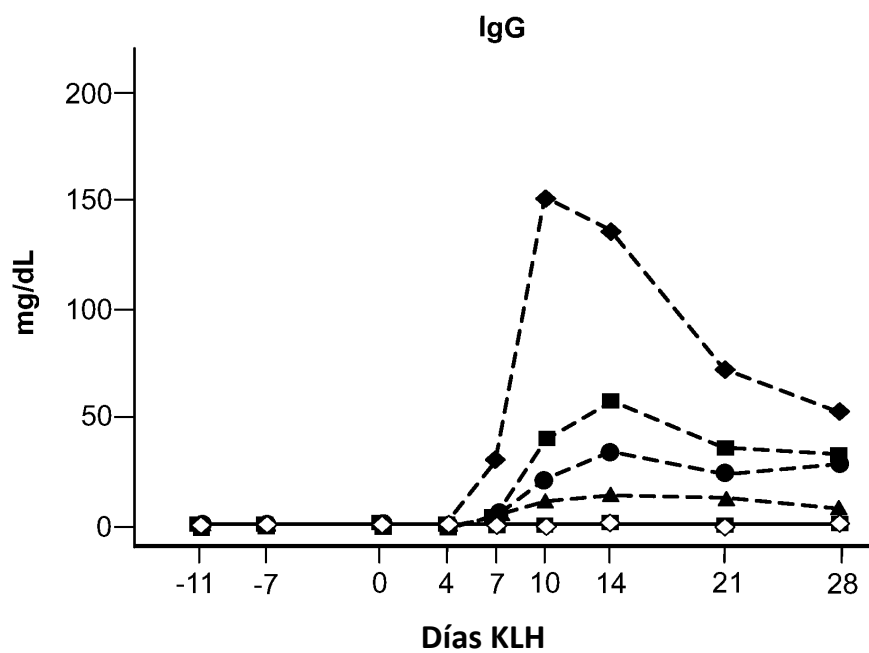
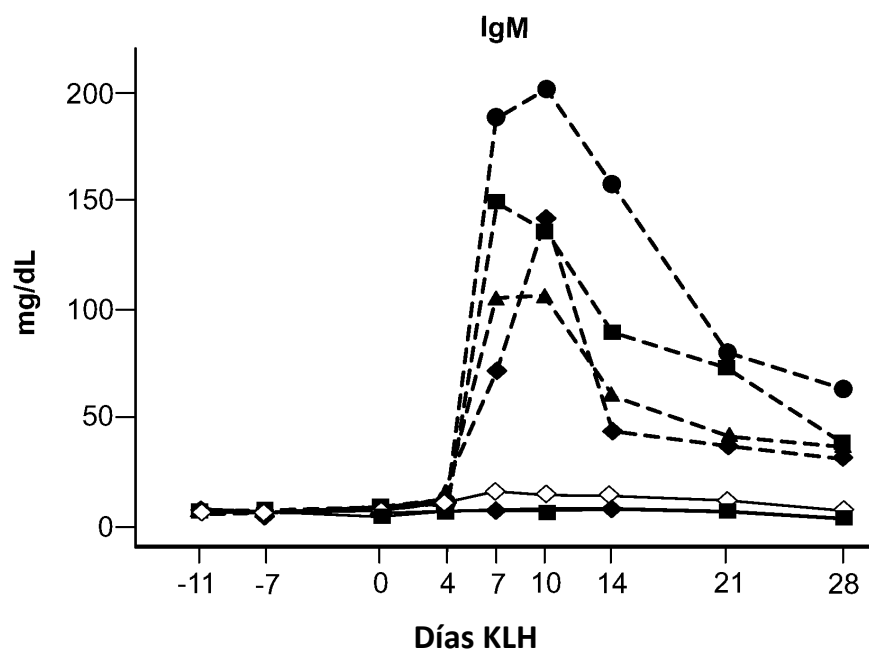


FIGURA 11A

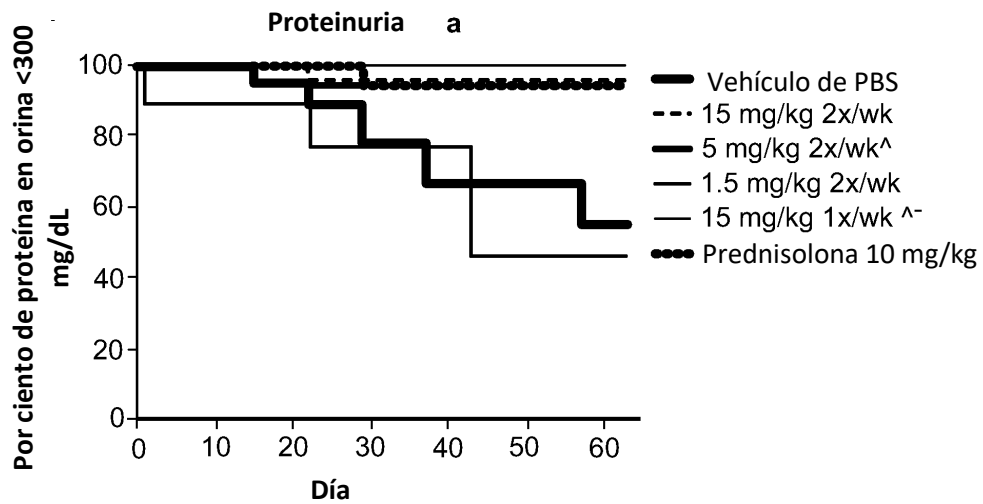
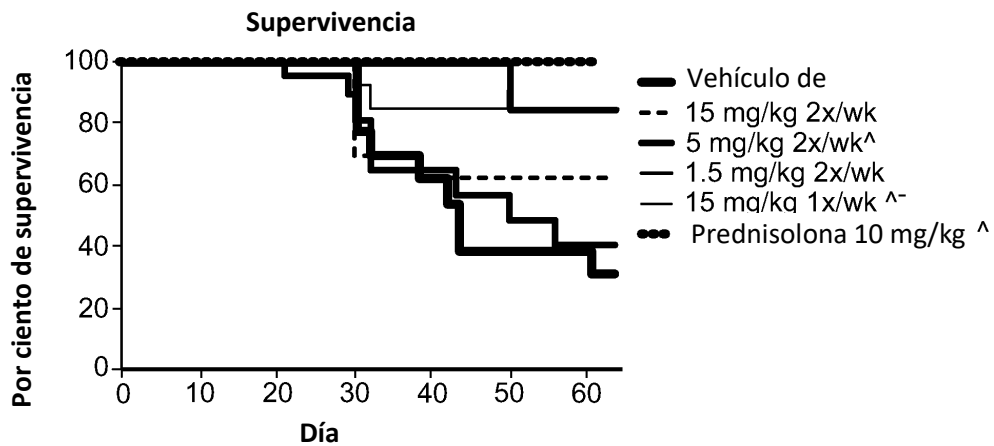


FIGURA 11B



[^]Valor *p* de supervivencia <0,05 Prueba de rango de registro de Mandel Cox

⁻ Pioceinuna versus Control de vehículo respectivo

FIGURA 12A

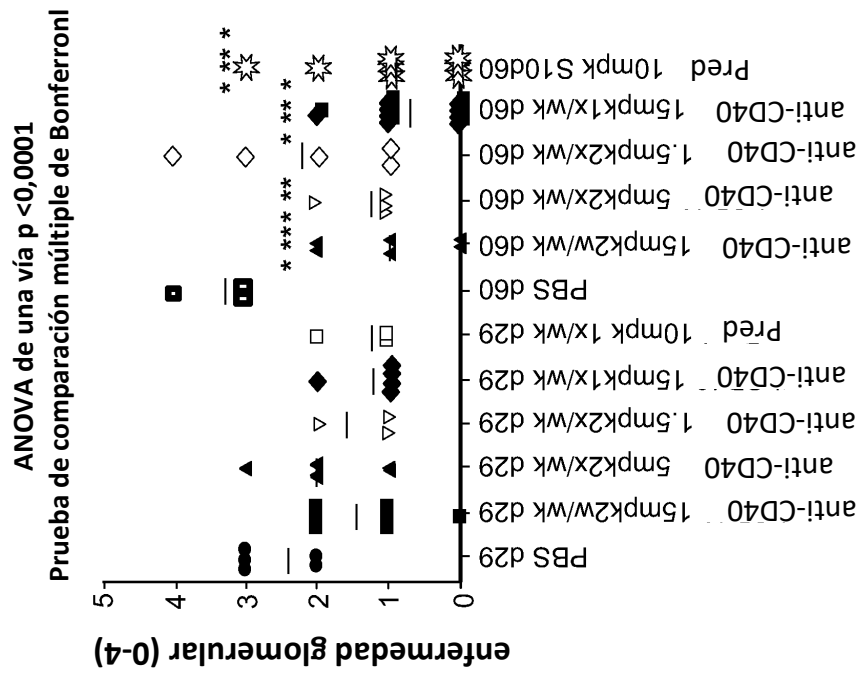


FIGURA 12B

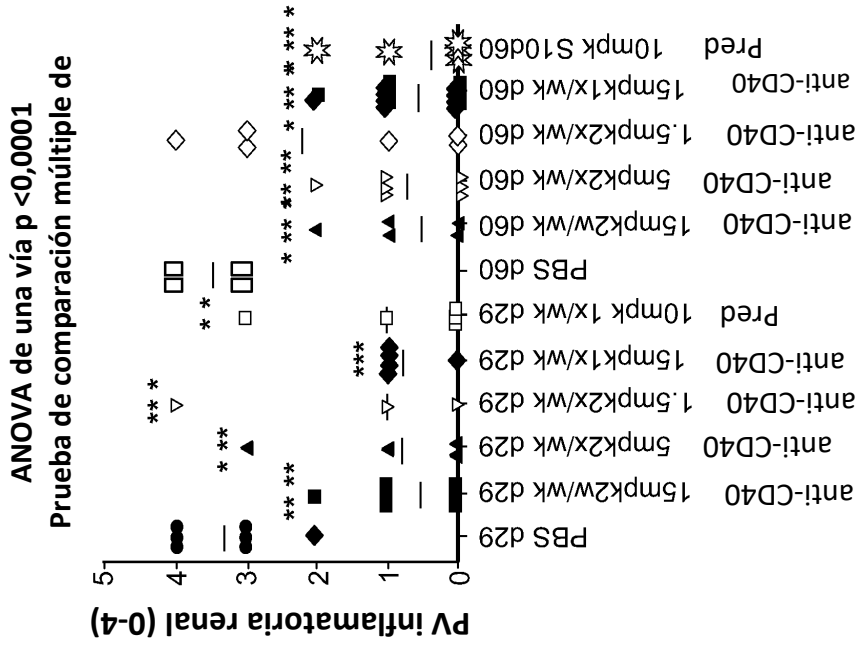


FIGURA 12C

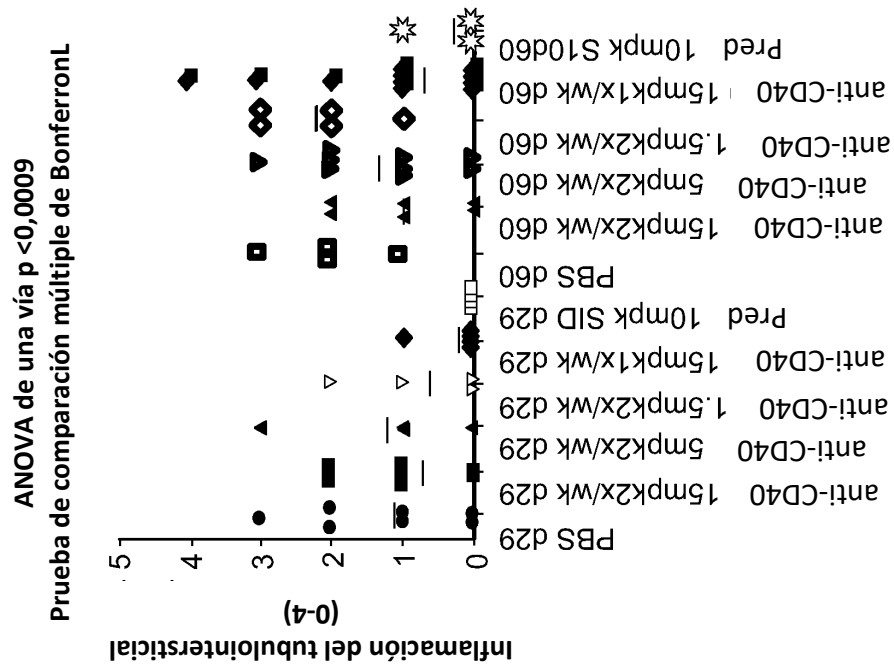


FIGURA 13A

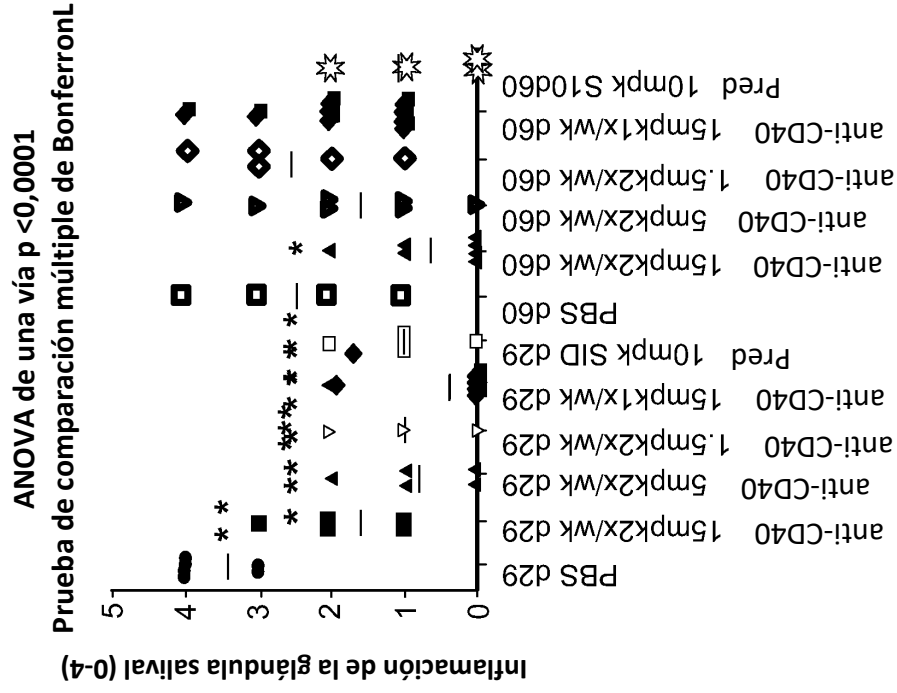


FIGURA 13B

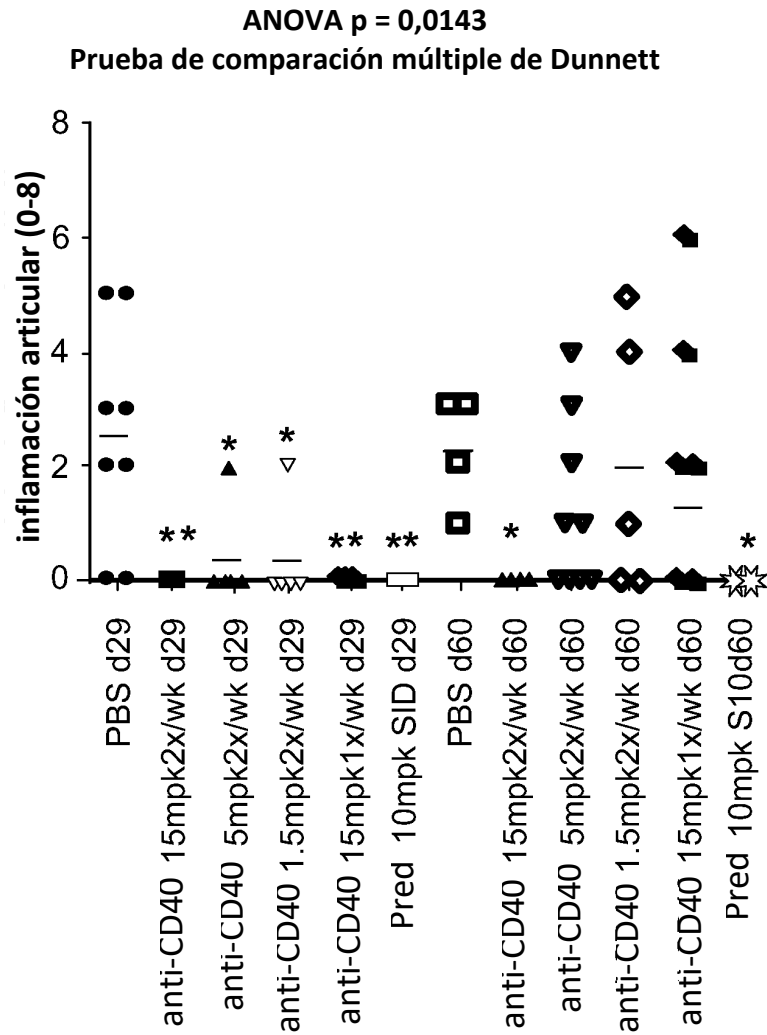


FIGURA 14

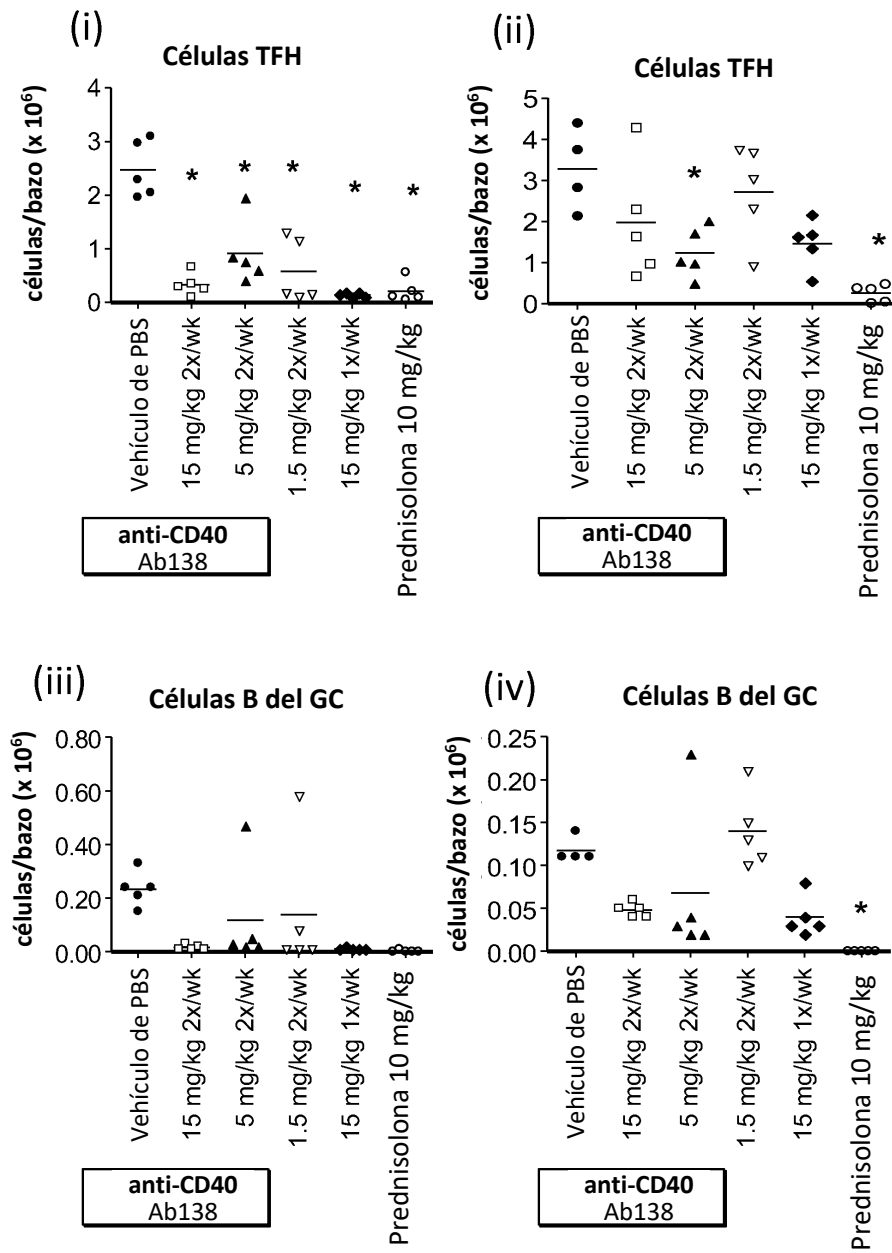


FIGURA 15B

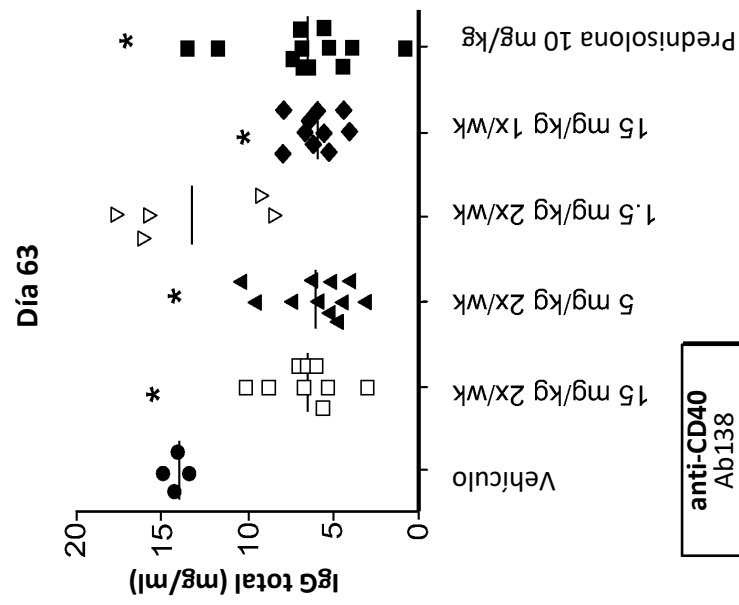


FIGURA 15A

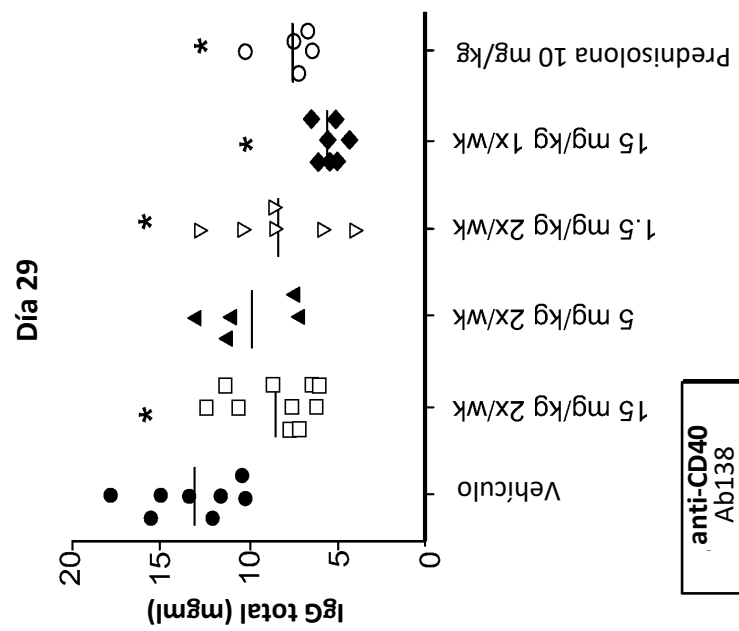
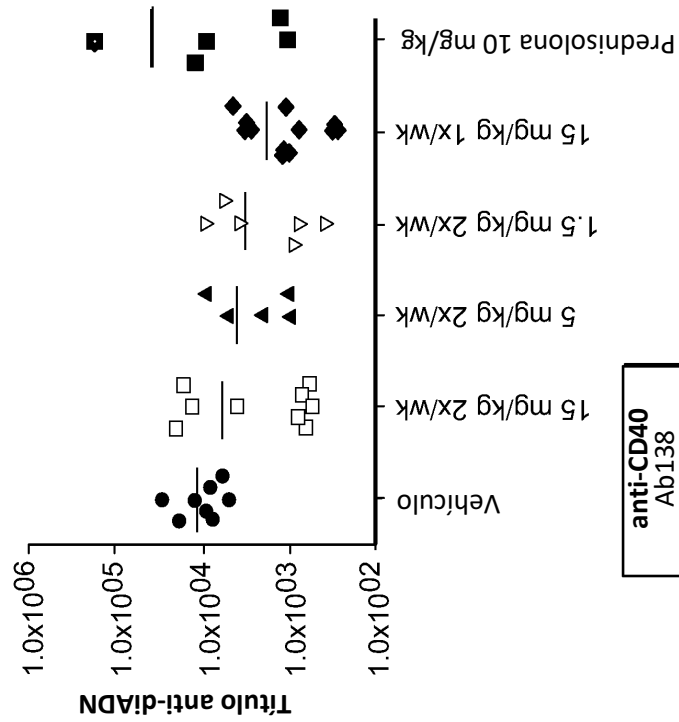


FIGURA 16A

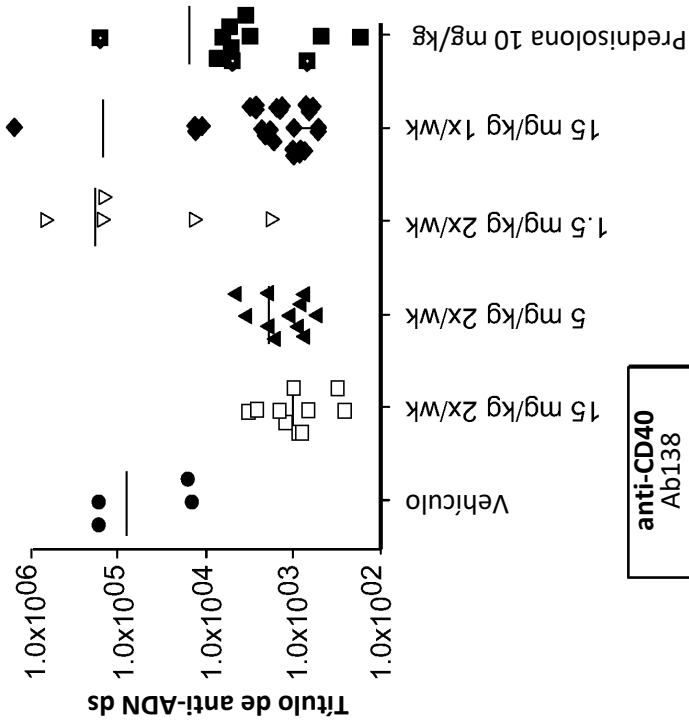
anti-dsADN
D29



anti-CD40
Ab138

FIGURA 16B

anti-dsADN
D63



anti-CD40
Ab138

FIGURA 17A

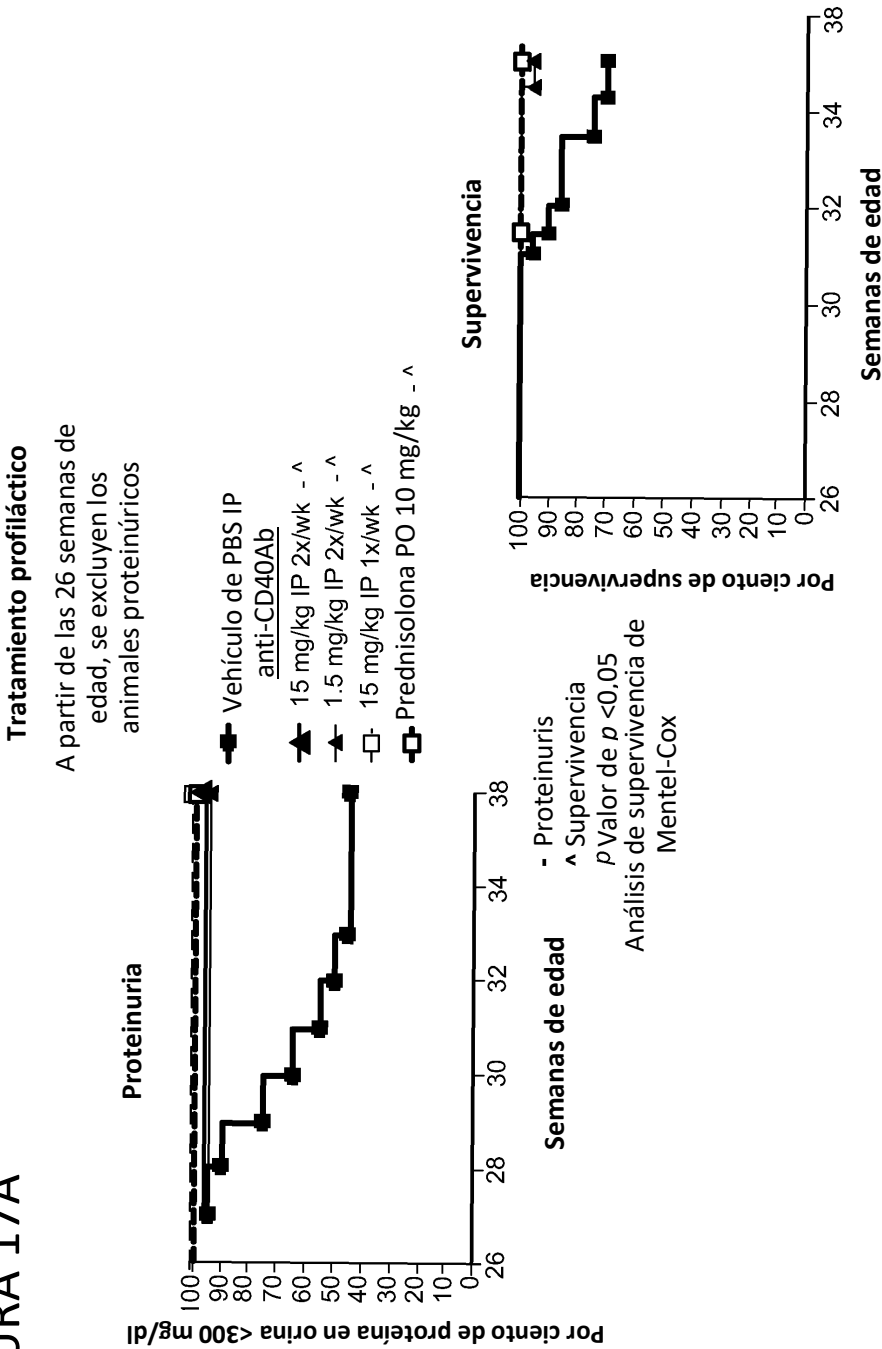


FIGURA 17B

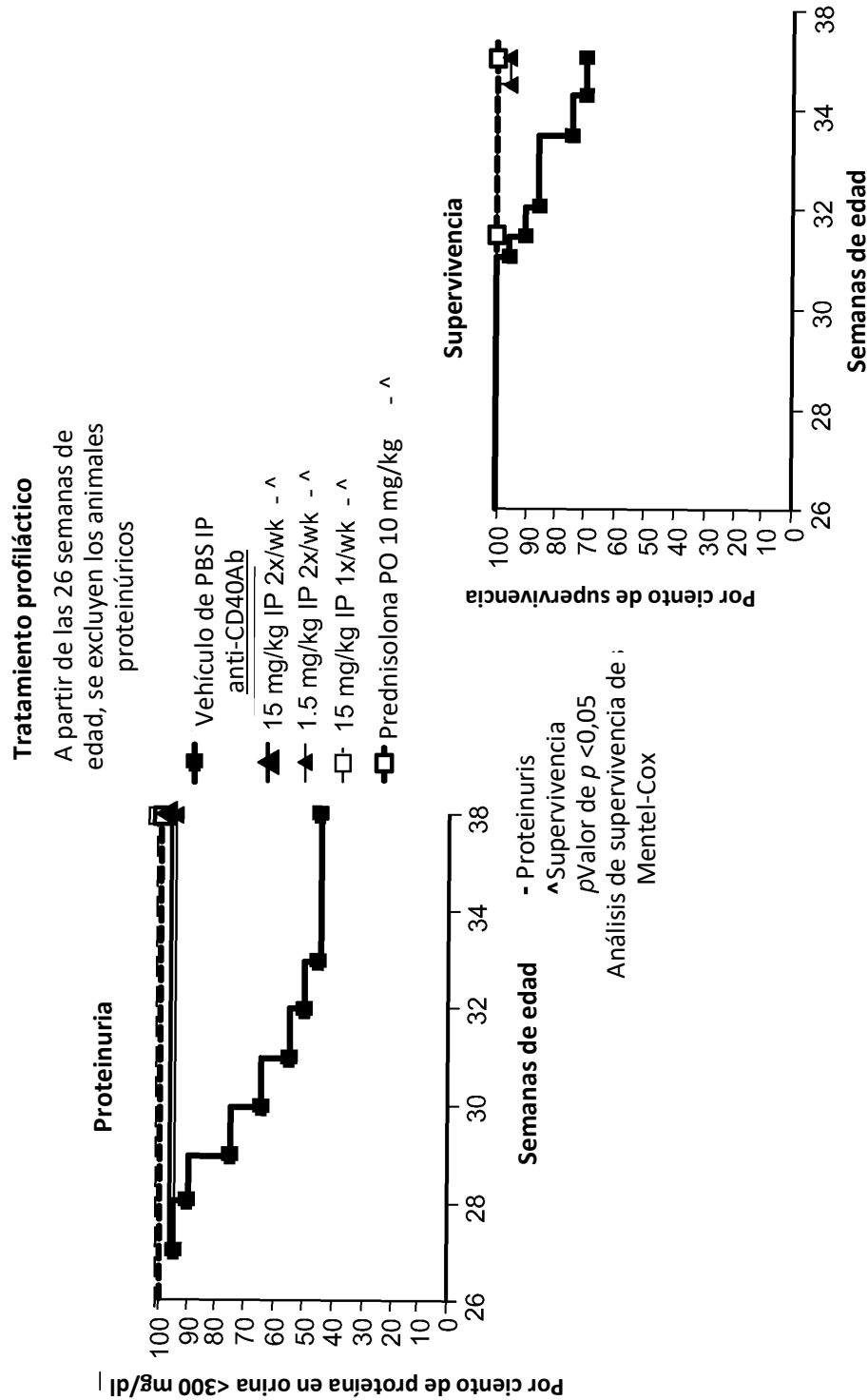


FIGURA 18A

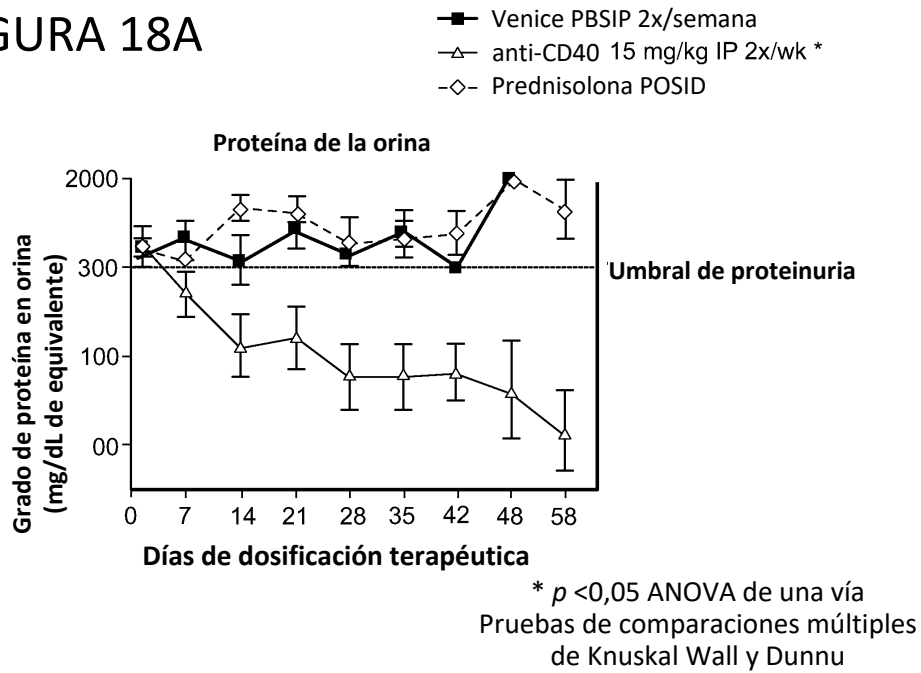


FIGURA 18B

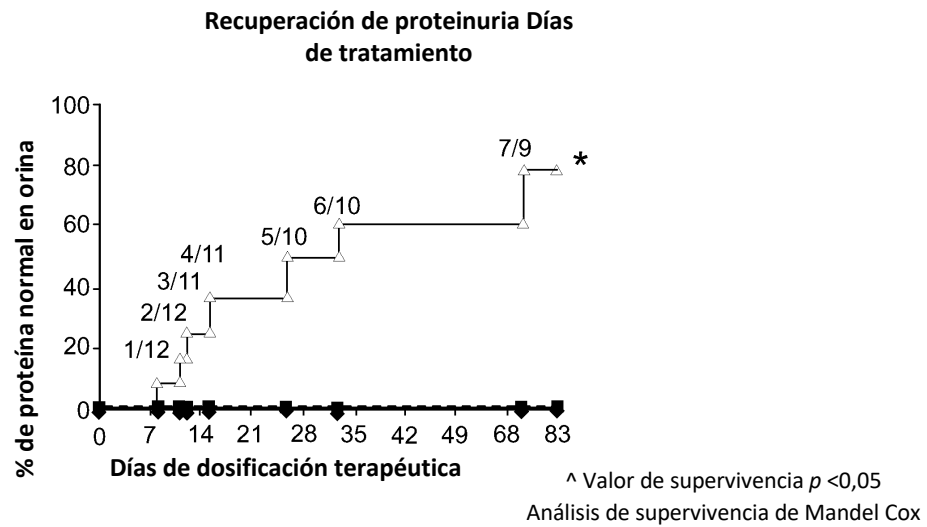


FIGURA 18C

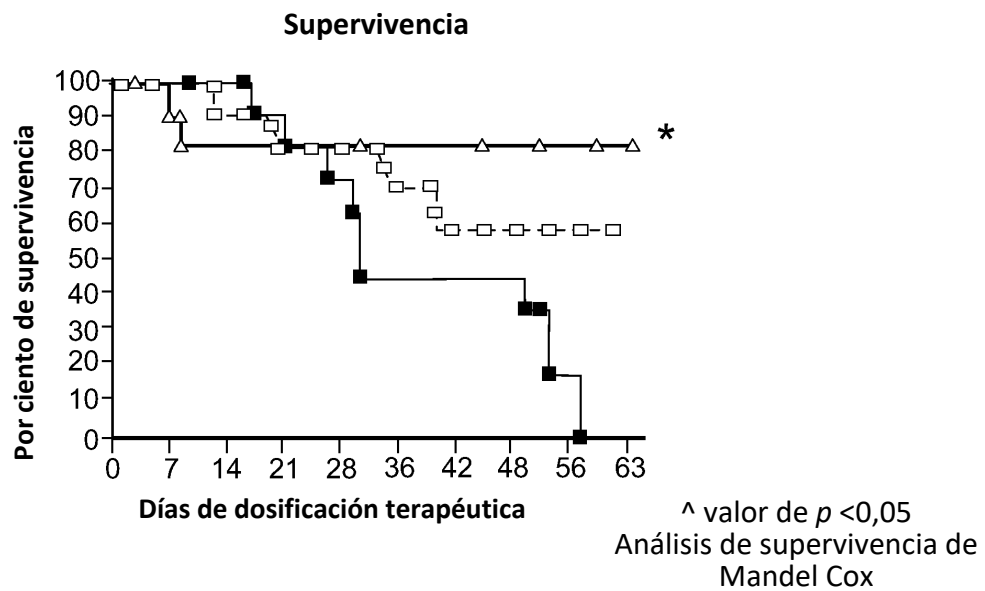


FIGURA 19A

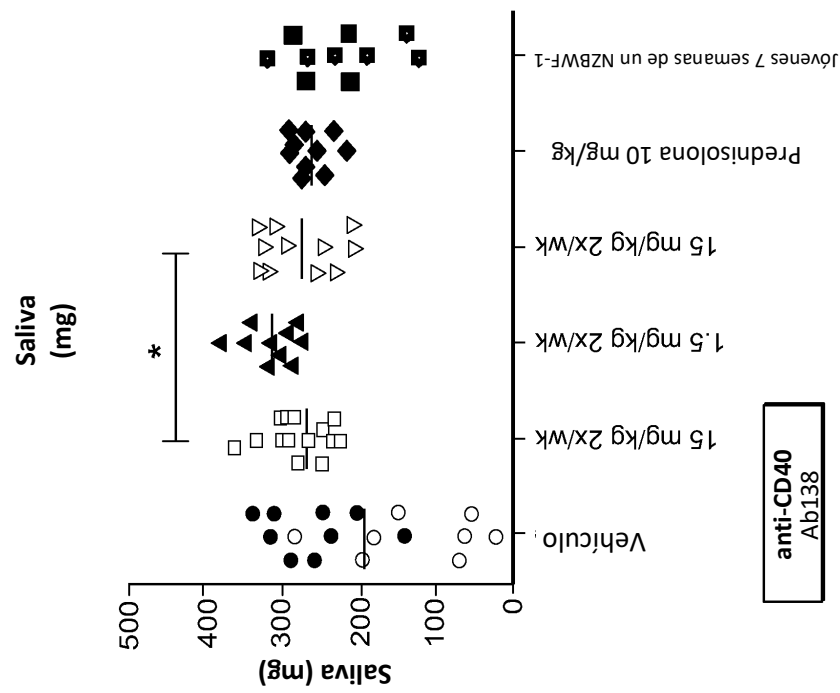


FIGURA 19B

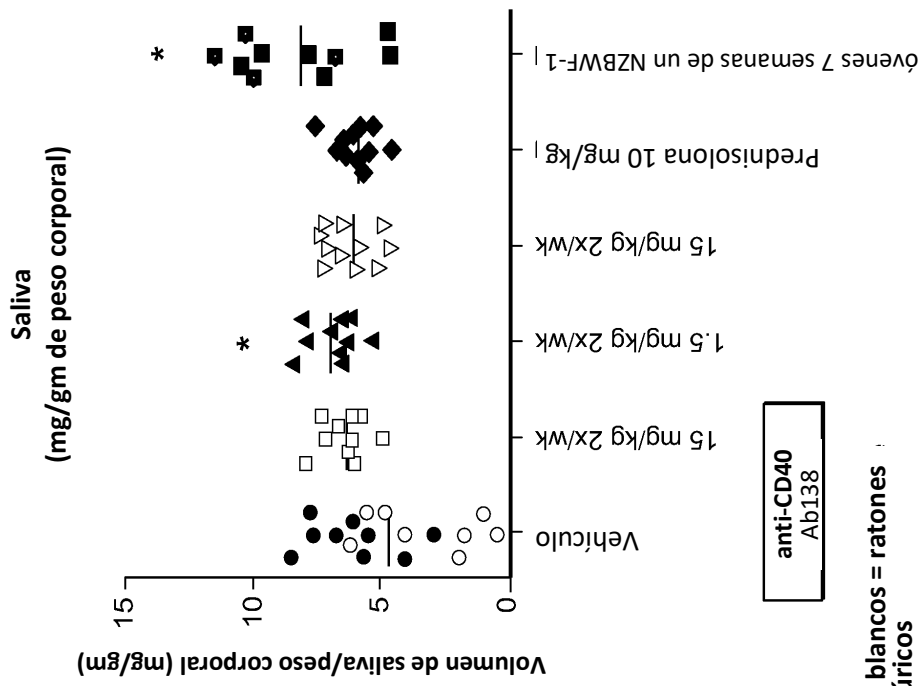


FIGURA 20A

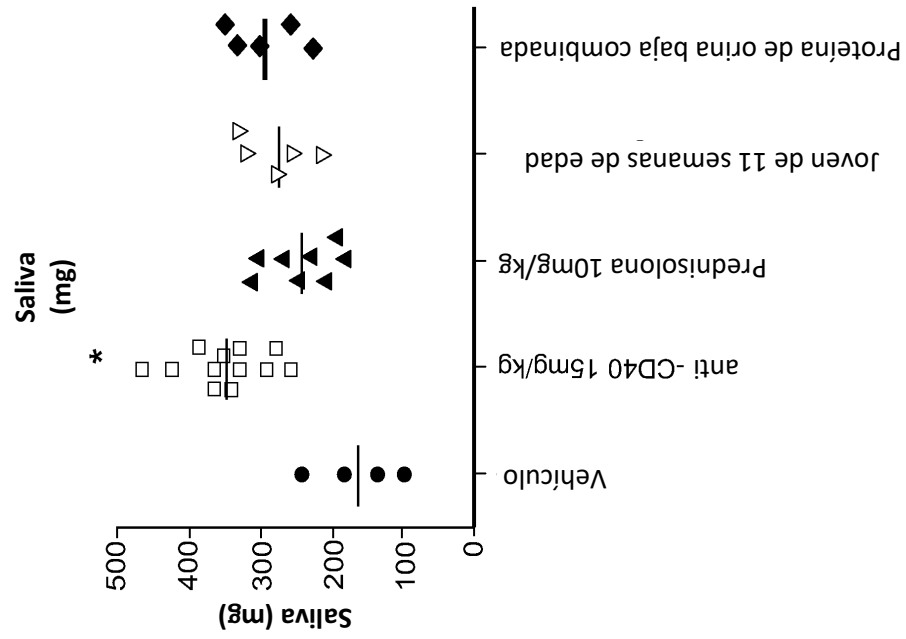


FIGURA 20B

