

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 785 206**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2014 PCT/EP2014/078555**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15091853**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2014 E 14828028 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 3083688**

54 Título: **Anticuerpos humanos anti-CD40 humano**

30 Prioridad:

19.12.2013 GB 201322583

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

06.10.2020

73 Titular/es:

ALLIGATOR BIOSCIENCE AB (100.0%)

**Medicon Village
223 81 Lund, SE**

72 Inventor/es:

**ELLMARK, PETER;
SMITH, KARIN ENELL y
VEITONMÄKI, NIINA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 785 206 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 humanos anti-CD40 humano

5 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a anticuerpos que se unen específicamente al CD40, y en particular al CD40 humano.

10 Antecedentes de la invención

El cáncer es una causa principal de muertes prematuras en el mundo desarrollado. El objetivo de la inmunoterapia en el cáncer es montar una respuesta inmunitaria eficaz del cuerpo contra el tumor. Esto se puede conseguir, por ejemplo, rompiendo la tolerancia contra un antígeno tumoral, aumentando las respuestas inmunitarias antitumorales, y estimulando las respuestas en el sitio del tumor. La célula efectora clave de una respuesta inmunitaria antitumoral a largo plazo es la célula T efectora específica. La activación incompleta de las células T efectoras, por ejemplo, por las células dendríticas pueden causar anergia de células T, lo que da como resultado una respuesta antitumoral ineficaz, mientras que la inducción adecuada por las células dendríticas puede generar una expansión potente de las células T efectoras activadas, redirigiendo la respuesta inmunitaria hacia el tumor.

La molécula del receptor CD40 en la superficie celular es un miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) y es un regulador clave tanto de respuestas inmunitarias innatas como adaptativas. Se expresa en las células humanas que presentan antígenos, en particular, células B, células dendríticas y macrófagos, así como sobre células normales, tales como fibroblastos, células de músculo liso, células endoteliales, y células epiteliales. Además, se expresa en un amplio intervalo de células tumorales incluyendo todos los linfomas B, de un 30 - 70 % de tumores sólidos, melanomas y carcinomas.

El ligando natural del CD40, denominado CD154 o CD40L, se expresa principalmente sobre los linfocitos T maduros. La señalización mediada por el CD40L desencadena varios eventos biológicos, que incluyen la activación, proliferación celular inmunitaria, y producción de citocinas y quimiocinas. Por lo tanto, la estimulación mediante el receptor de CD40 aumenta las funciones celulares e inmunitarias. Este papel en las respuestas inmunitarias mediadas por células es bien conocido. Por ejemplo, la activación de células dendríticas mediante la estimulación con CD40, induce la activación de las células T efectoras. El tratamiento con agonistas del CD40 puede proporcionar por lo tanto los medios para redirigir la respuesta inmunitaria y expandir las células T efectoras hacia las células tumorales.

Se han publicado efectos antitumorales para algunos anticuerpos anti-CD40, identificándose varios mecanismos. Se observó un efecto indirecto en los tumores negativos al CD40 que implicaba la activación de las células presentadoras de antígeno, en particular un aumento de actividad de los linfocitos T citotóxicos específicos del tumor y las células citolíticas naturales (células NK). Se observó un mecanismo antitumoral directo en los tumores positivos al CD40, en el que la unión del anticuerpo CD40 a las células tumorales induce la apoptosis. Estos mecanismos de actividad antitumoral se pueden complementar mediante la estimulación de una respuesta humoral que dé lugar a un aumento de la citotoxicidad celular mediada por anticuerpo (ADCC). Sin embargo, la administración sistémica de anticuerpos anti-CD40 se ha asociado también con efectos secundarios adversos, tales como síndrome de shock y síndrome de liberación de citocinas.

Gracias al documento WO 01/83755 se conoce la preparación de los anticuerpos humanos F1-102, y F5-152 que se unen al CD40 humano, que son agonistas y modulan la actividad de una célula que expresa el CD40.

En consecuencia, sigue existiendo una necesidad de terapias mejoradas para el cáncer, en particular, anticuerpos anti-CD40 adecuados para su uso en terapia.

Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones. Los presentes inventores han producido anticuerpos que son adecuados para su uso en terapia. Los anticuerpos de la presente invención se unen específicamente al CD40 humano. Los anticuerpos de la presente invención se unen normalmente al CD40 humano cuando se localiza en la superficie de una célula.

La invención proporciona un anticuerpo humano, o fragmento del mismo, específicos para el CD40 humano que:

- (a) se une específicamente al CD40 humano cuando se localiza sobre la superficie de una célula; y/o
- (b) aumenta la lisis mediada por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) de una célula que expresa el CD40; y/o
- (c) aumenta la apoptosis de una célula que expresa el CD40; y/o
- (d) modula la actividad de una célula que expresa el CD40, en la que dicha modulación es un aumento o

disminución de la actividad de dicha célula; y/o

(e) bloquea la unión del CD40L al CD40, reduce la unión del CD40L al CD40, o no bloquea ni reduce la unión del CD40L al CD40.

5 El anticuerpo o fragmento de la presente divulgación puede comprender:

(a) una secuencia de CDR3 de cadena pesada que tiene 12 aminoácidos de longitud y que comprende la secuencia de consenso de A, R, G, P, F/V/A, Y, S, S/T, V/Y/F, F/I/L, D, Y, una secuencia de CDR1 de cadena pesada que consiste en la secuencia GFTFSSYA, y una secuencia de CDR3 de cadena ligera que consiste en la secuencia QQSYSTPYT, cuyo anticuerpo o fragmento no bloquea ni reduce la unión del CD40L al CD40, y/o se une al módulo B del dominio 3 del CD40; o

(b) una secuencia de CDR3 de cadena pesada que tiene 9 o 10 aminoácidos de longitud y que comprende la secuencia de consenso de A, R, A/Y/R, V, -/N, F, G, F/M/I, D, Y, cuyo anticuerpo o fragmento reduce la unión del CD40L al CD40 y/o se une al módulo B del dominio 1 del CD40.

15 El anticuerpo o fragmento tiene normalmente las secuencias de CDR seleccionadas de entre:

(a) las SEQ ID NO 43, 44, 45, 46, 47 y 48 (CDR del anticuerpo 1140/1135); o

(b) las SEQ ID NO 13, 14, 15, 16, 17 y 18 (CDR del anticuerpo 1132/1133); o

(c) las SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5 y 6 (CDR del anticuerpo 1146/1147); o

(d) las SEQ ID NO 7, 8, 9, 10, 11 y 12 (CDR del anticuerpo 1142/1135); o

(e) las SEQ ID NO 19, 20, 21, 22, 23 y 24 (CDR del anticuerpo 1148/1149); o

(f) las SEQ ID NO 25, 26, 27, 28, 29 y 30 (CDR del anticuerpo 1138/1135); o

(g) las SEQ ID NO 31, 32, 33, 34, 35 y 36 (CDR del anticuerpo 1134/1135); o (h) las SEQ ID NO 37, 38, 39, 40, 41 y 42 (CDR del anticuerpo 1136/1137); o (i) las SEQ ID NO 49, 50, 51, 52, 53 y 54 (CDR del anticuerpo 1150/1151); o

(j) las SEQ ID NO 55, 56, 57, 58, 59 y 60 (CDR del anticuerpo 1107/1108).

30 Un anticuerpo de la invención tiene preferentemente un punto isoeléctrico (pI) de 9,0 o por encima, preferentemente de 9,2 o por encima, más preferentemente de 9,25 o por encima.

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden utilizarse en el tratamiento de enfermedades o trastornos, y en particular en el tratamiento del cáncer.

35 Breve descripción del listado de secuencias

Las SEQ ID NO 1 a 80 proporcionan las siguientes secuencias de aminoácidos:

Las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 son las CDR 1, 2 y 3, respectivamente de la cadena pesada del anticuerpo 1146/1147.

Las SEQ ID NO: 4, 5 y 6 son las CDR 1, 2 y 3, respectivamente de la cadena ligera del anticuerpo 1146/1147.

Las SEQ ID NO: 7, 8 y 9 son las CDR 1, 2 y 3, respectivamente de la cadena pesada del anticuerpo 1142/1135.

Las SEQ ID NO: 10, 11 y 12 son las CDR 1, 2 y 3, respectivamente de la cadena ligera del anticuerpo 1142/1135. Las SEQ ID NO: 13, 14 y 15 son las CDR 1, 2 y 3, respectivamente de la cadena pesada del anticuerpo 1132/1133.

Las SEQ ID NO: 16, 17 y 18 son las CDR 1, 2 y 3, respectivamente de la cadena ligera del anticuerpo 1132/1133. Las SEQ ID NO: 19, 20 y 21 son las CDR 1, 2 y 3, respectivamente de la cadena pesada del anticuerpo 1148/1149.

Las SEQ ID NO: 22, 23 y 24 son las CDR 1, 2 y 3, respectivamente de la cadena ligera del anticuerpo 1148/1149. Las SEQ ID NO: 25, 26 y 27 son las CDR 1, 2 y 3, respectivamente de la cadena pesada del anticuerpo 1138/1135.

Las SEQ ID NO: 28, 29 y 30 son las CDR 1, 2 y 3, respectivamente de la cadena ligera del anticuerpo 1138/1135. Las SEQ ID NO: 31, 32 y 33 son las CDR 1, 2 y 3, respectivamente de la cadena pesada del anticuerpo 1134/1135.

Las SEQ ID NO: 34, 35 y 36 son las CDR 1, 2 y 3, respectivamente de la cadena ligera del anticuerpo 1134/1135. Las SEQ ID NO: 37, 38 y 39 son las CDR 1, 2 y 3, respectivamente de la cadena pesada del anticuerpo 1136/1137.

Las SEQ ID NO: 40, 41 y 42 son las CDR 1, 2 y 3, respectivamente de la cadena ligera del anticuerpo 1136/1137. Las SEQ ID NO: 43, 44 y 45 son las CDR 1, 2 y 3, respectivamente de la cadena pesada del anticuerpo 1140/1135.

Las SEQ ID NO: 46, 47 y 48 son las CDR 1, 2 y 3, respectivamente de la cadena ligera del anticuerpo 1140/1135. Las SEQ ID NO: 49, 50 y 51 son las CDR 1, 2 y 3, respectivamente de la cadena pesada del anticuerpo 1150/1151.

Las SEQ ID NO: 52, 53 y 54 son las CDR 1, 2 y 3, respectivamente de la cadena ligera del anticuerpo 1150/1151. Las SEQ ID NO: 55, 56 y 57 son las CDR 1, 2 y 3, respectivamente de la cadena pesada del anticuerpo 1107/1108.

Las SEQ ID NO: 58, 59 y 60 son las CDR 1, 2 y 3, respectivamente de la cadena ligera del anticuerpo

- 1107/1108. La SEQ ID NO: 61 es la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 1146/1147.
 La SEQ ID NO: 62 es la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 1146/1147.
 La SEQ ID NO: 63 es la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 1142/1135.
 La SEQ ID NO: 64 es la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 1142/1135.
 5 La SEQ ID NO: 65 es la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 1132/1133.
 La SEQ ID NO: 66 es la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 1132/1133.
 La SEQ ID NO: 67 es la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 1148/1149.
 La SEQ ID NO: 68 es la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 1148/1149.
 La SEQ ID NO: 69 es la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 1138/1135.
 10 La SEQ ID NO: 70 es la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 1138/1135.
 La SEQ ID NO: 71 es la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 1134/1135.
 La SEQ ID NO: 72 es la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 1134/1135.
 La SEQ ID NO: 73 es la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 1136/1137.
 La SEQ ID NO: 74 es la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 1136/1137.
 15 La SEQ ID NO: 75 es la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 1140/1135.
 La SEQ ID NO: 76 es la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 1140/1135.
 La SEQ ID NO: 77 es la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 1150/1151.
 La SEQ ID NO: 78 es la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 1150/1151.
 La SEQ ID NO: 79 es la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 1107/1108.
 20 La SEQ ID NO: 80 es la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 1107/1108.

Las SEQ ID NO: 81 a 100 proporcionan las siguientes secuencias de nucleótidos:

- 25 La SEQ ID NO: 81 codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 1146/1147.
 La SEQ ID NO: 82 codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 1146/1147.
 La SEQ ID NO: 83 codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 1142/1135.
 La SEQ ID NO: 84 codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 1142/1135.
 La SEQ ID NO: 85 codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 1132/1133.
 La SEQ ID NO: 86 codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 1132/1133.
 30 La SEQ ID NO: 87 codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 1148/1149.
 La SEQ ID NO: 88 codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 1148/1149.
 La SEQ ID NO: 89 codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 1138/1135.
 La SEQ ID NO: 90 codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 1138/1135.
 La SEQ ID NO: 91 codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 1134/1135.
 35 La SEQ ID NO: 92 codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 1134/1135.
 La SEQ ID NO: 93 codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 1136/1137.
 La SEQ ID NO: 94 codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 1136/1137.
 La SEQ ID NO: 95 codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 1140/1135.
 La SEQ ID NO: 96 codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 1140/1135.
 40 La SEQ ID NO: 97 codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 1150/1151.
 La SEQ ID NO: 98 codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 1150/1151.
 La SEQ ID NO: 99 codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 1107/1108.
 La SEQ ID NO: 100 codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 1107/1108.
 La SEQ ID NO: 101 es la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada a modo de
 45 ejemplo.
 La SEQ ID NO: 102 es la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada a modo de
 ejemplo.
 La SEQ ID NO: 103 es la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena ligera a modo de
 ejemplo.
 50 La SEQ ID NO: 104 es la secuencia de aminoácidos del CD40 humano.
 La SEQ ID NO: 105 es la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular monomérico del CD86 humano de
 tipo silvestre, excluyendo una secuencia de señal de 23 aminoácidos del extremo N.
 Las SEQ ID NO: 106 a 108 son variantes a modo de ejemplo de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:
 105.

Breve descripción de las figuras

- 60 La Figura 1 muestra los resultados de un ELISA de unión a CD40 para (A) los anticuerpos 1107/1108,
 1148/1149, 1136/1137; (B) los anticuerpos 1142/1135, 1146/1147, 1132/1133; (C) los anticuerpos 1134/1135,
 1138/1135, 1140/1135; y (D) el anticuerpo 1150/1151.
 La Figura 2 muestra los resultados de un ensayo de proliferación de células B para los anticuerpos listados en la
 leyenda de la figura.
 La Figura 3 muestra los resultados de un ensayo que ensayaba la capacidad de los anticuerpos para competir
 con el CD40L por la unión al CD40. MFI = intensidad de fluorescencia media.
 65 La Figura 4 muestra los resultados de un ensayo para la activación de las células dendríticas en los ganglios
 linfáticos de drenaje después de diferentes modos de administración de un anticuerpo anti-CD40 en un modelo

tumoral de ratón. Administración intratumoral (IT), administración intraperitoneal (IP). La activación se indica por el nivel de expresión de CD86, medido por la intensidad de fluorescencia media (MFI).

La Figura 5 muestra los resultados de un ensayo para la activación de las células positivas a CD11c en los ganglios linfáticos de drenaje después de diferentes modos de administración de un anticuerpo anti-CD40 en un modelo tumoral de ratón. Administración intratumoral (IT), administración intraperitoneal (IP). La activación se indica por el nivel de expresión de CD86, medido por la intensidad de fluorescencia media (MFI).

La Figura 6 muestra los resultados de un ensayo para la activación de las células positivas a CD11b en los ganglios linfáticos de drenaje después de diferentes modos de administración de un anticuerpo anti-CD40 en un modelo tumoral de ratón. Administración intratumoral (IT), administración intraperitoneal (IP). La activación se indica por el nivel de expresión de CD86, medido por la intensidad de fluorescencia media (MFI).

La Figura 7 muestra el cambio en el volumen tumoral a lo largo del tiempo en un modelo tumoral de ratón a continuación del tratamiento con anticuerpos anti-CD40 como se muestra, con respecto a un isotipo de control.

La Figura 8 muestra la supervivencia a lo largo del tiempo en un modelo tumoral de ratón tratado con un clon del anticuerpo CD40 1132/1133 (**, $p < 0,01$). Se observó una supervivencia significativa en los animales tratados con respecto al control.

La Figura 9 muestra la supervivencia a lo largo del tiempo en un modelo en el que los ratones curados previamente de un tumor mediante un tratamiento con anticuerpo anti-CD40 se volvían a desafiar con células tumorales, en comparación con ratones intactos (no desafiados ni tratados previamente). Existe una memoria inmunológica en los ratones tratados previamente con un anti-CD40.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen al CD40. La invención también se refiere a los usos de dichos anticuerpos, tales como los usos terapéuticos. Los anticuerpos se unen preferentemente de manera específica al CD40, es decir, se unen al CD40, pero no se unen, o se unen con menor afinidad, a otras moléculas. El término CD40 como se utiliza en el presente documento se refiere al CD40 humano. La secuencia del CD40 humano se expone en la SEQ ID NO: 104. Un anticuerpo de la presente invención puede tener algo de afinidad de unión por el CD40 de otros mamíferos, por ejemplo, por el CD40 de primates o el murino. Los anticuerpos se unen preferentemente al CD40 humano cuando se localiza en la superficie de una célula.

Un anticuerpo de la invención tiene la capacidad de unirse al CD40 en su estado nativo y en particular al CD40 localizado en la superficie de una célula. Preferentemente, un anticuerpo de la invención se unirá específicamente al CD40. Es decir, un anticuerpo de la invención se unirá preferentemente al CD40 con mayor afinidad de unión que con la que se une a otra molécula.

Por "localizado sobre la superficie de una célula" se quiere decir que el CD40 se asocia con la célula de manera que una o más regiones del CD40 están presente en la superficie exterior de la superficie celular. Por ejemplo, el CD40 puede estar insertado en la membrana plasmática celular (es decir, se oriente como una proteína transmembrana) con una o más regiones presentadas en la superficie extracelular. Esto puede producirse en el transcurso de la expresión del CD40 por la célula. Por lo tanto, en una realización, "localizado sobre la superficie de una célula" puede significar "expresado en la superficie de una célula". De manera alternativa, el CD40 puede estar fuera de la célula localizándose con interacciones covalentes y/o iónicas en una región o regiones específicas de la superficie celular.

Un anticuerpo de la invención puede aumentar la lisis mediada por ADCC de una célula que exprese el CD40 y/o aumentar la apoptosis de una célula que exprese el CD40. La célula es normalmente una célula tumoral. Por "aumento" se quiere decir que el número de células lisadas o con apoptosis aumenta en presencia del anticuerpo de la invención, con respecto al número células lisadas o con apoptosis en presencia de una sustancia de control apropiada. Los métodos para la determinación del nivel de lisis o apoptosis mediada por ADCC en una muestra se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo de liberación de cromo-51 o un ensayo de liberación de azufre-35. En dichos ensayos, se incubaba una línea celular diana previamente marcada que exprese el antígeno (en este caso el CD40) con un anticuerpo que se vaya a ensayar. Después del lavado, las células efectoras (que normalmente expresan el receptor de CD16 de Fc) se co-incubaban con las células diana marcadas con el anticuerpo. La lisis de las células diana se mide posteriormente por la liberación de un marcador intracelular mediante un contador de centelleo o por espectrofotometría.

Como alternativa a la marcación con radioisótopos necesarios en dichos ensayos, se pueden utilizar métodos en los que la lisis se detecta midiendo la liberación de enzimas que estén presentes naturalmente en las células diana. Esto se puede conseguir mediante la detección (por ejemplo, la detección bioluminiscente) de los productos de una reacción catalizada por la enzima. No es necesario el marcado previo de las células en dicho ensayo. Una enzima típica que se detecta con dicho ensayo es la GAPDH.

Un anticuerpo de la invención puede modular la actividad de una célula que exprese el CD40, en la que dicha modulación es un aumento o disminución de la actividad de dicha célula. La célula normalmente es una célula dendrítica, una célula B, un macrófago, un monocito, o cualquier célula mielóide. La célula puede ser positiva a CD11b o positiva a CD11c.

Las APC profesionales, tales como las células dendríticas, se activan cuando se produce la señalización mediante el CD40, que desencadena varios eventos biológicos, incluyendo la activación de la célula inmunitaria, la proliferación y la producción de citocinas y quimiocinas. Los métodos para la determinación de la activación de las células dendríticas asociada con el CD40 se conocen en la técnica (que se exponen, por ejemplo, en Schonbeck et al., 2001, *Cell Mol Life Sci.*, 58:40-43; van Kooten et al., 2000, *J. Leuk., Biol.*, 67: 2-17) y se describen posteriormente de manera adicional, incluyendo en los Ejemplos.

La estimulación de las células B humanas con el CD40L recombinante o los anticuerpos anti-CD40 induce la regulación positiva de marcadores de superficie, tales como CD23, CD30, CD80, CD86, Fas y MHC II, la secreción de citocinas solubles, por ejemplo, IL-6, TNF- γ y TNF- α , y la agregación homeotípica. Los métodos para la determinación de la activación de células B relacionada con el CD40 se conocen en la técnica (que se exponen, por ejemplo, en Schonbeck et al., 2001, *supra*) y se describen posteriormente de manera adicional, incluyendo en los Ejemplos.

Los métodos y ensayos para la determinación de la capacidad de un anticuerpo para modular la actividad de las células dendríticas y las células B se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se puede evaluar la activación de las células dendríticas midiendo el nivel de marcadores de superficie celular tales como CD86 y CD80 y/o midiendo la secreción de IFN γ por las células T inducida por anticuerpos anti-CD40, en el que un aumento de cualquiera de los parámetros indica el aumento de activación y una disminución representa una disminución de la activación. De manera similar, se puede evaluar la capacidad de un anticuerpo para modular la actividad de las células B midiendo el nivel de marcadores de superficie celular (tales como CD86) y/o midiendo la proliferación de células B inducida por anticuerpos anti-CD40 (véase el Ejemplo 3 posteriormente), en el que un aumento de cualquiera de estos parámetros indica el aumento de activación y una disminución representa una disminución de la activación.

Preferentemente, un anticuerpo de la invención que aumente la activación de las células dendríticas o las células B tiene una potencia de activación de células dendríticas o células B (que se mide como una CE50 como se describe en el Ejemplo 3) de 5 $\mu\text{g/ml}$ o menor, 4 $\mu\text{g/ml}$ o menor, 3 $\mu\text{g/ml}$ o menor, 2,5 $\mu\text{g/ml}$ o menor, 1,5 $\mu\text{g/ml}$ o menor, 1,0 $\mu\text{g/ml}$ o menor, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ o menor, 0,4 $\mu\text{g/ml}$ o menor, 0,3 $\mu\text{g/ml}$ o menor, o 0,2 $\mu\text{g/ml}$ o menor. La CE50 normalmente será mayor de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ y por lo tanto la CE50 puede estar entre 0,1 $\mu\text{g/ml}$ y cualquiera de los límites superiores especificados en el párrafo anterior.

Las expresiones "actividad de unión" y "afinidad de unión" tienen la intención de referirse a la tendencia de una molécula de anticuerpo para unirse o no unirse a una diana. La afinidad de unión puede cuantificarse determinando la constante de disociación (K_d) para un anticuerpo y su diana. De manera similar, la especificidad de unión de un anticuerpo a su diana se puede definir en términos de constantes de disociación comparativas (K_d) del anticuerpo por su diana en comparación con la constante de disociación con respecto al anticuerpo y otra molécula no diana.

Normalmente, la K_d para el anticuerpo con respecto a la diana será 2 veces, preferentemente 5 veces, más preferentemente 10 veces menor que la K_d con respecto a otra molécula no diana tal como un material no relacionado o un material que lo acompañe en el entorno. Más preferentemente, la K_d será 50 veces menor, incluso más preferentemente 100 veces menor, y más preferentemente aún 200 veces menor.

El valor de esta constante de disociación se puede determinar directamente por métodos bien conocidos tales como los que se exponen, por ejemplo, en Caceci et al. (*Byte* 9:340-362, 1984). Por ejemplo, la K_d puede establecerse utilizando un ensayo de unión en filtro de nitrocelulosa de doble filtro tal como se desvela en Wong & Lohman (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5428-5432, 1993).

Un método preferido para la evaluación de la afinidad de unión por el CD40 es mediante ELISA. Preferentemente, un anticuerpo de la invención tiene una afinidad por el CD40 (medida como una CE50, como se describe en el Ejemplo 3) de 2500 ng/ml o menor, 1500 ng/ml o menor, 1000 ng/ml o menor, 600 ng/ml o menor, 350 ng/ml o menor, 50 ng/ml o menor, 40 ng/ml o menor, 30 ng/ml o menor, 20 ng/ml o menor, o 10 ng/ml o menor. La CE50 normalmente será mayor de 1 ng/ml y por lo tanto la CE50 puede estar entre 1 ng/ml y cualquiera de los límites superiores especificados en el párrafo anterior. Se conocen en la técnica otros ensayos convencionales para evaluar la capacidad de unión de ligandos tales como de anticuerpos a las dianas, incluyendo, por ejemplo, las transferencias de Western, RIA, y análisis de citometría de flujo. Las cinéticas de unión (por ejemplo, la afinidad de unión) del anticuerpo se puede evaluar también mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica, tales como el análisis por resonancia de plasmones superficiales (por ejemplo, el sistema Biacore™). Esta forma de análisis también se describe en los Ejemplos. La constante de afinidad (K_D) para la unión de un anticuerpo de la invención al CD40 está preferentemente en el intervalo de 1-10 nM. La velocidad de asociación (k_a) está preferentemente en el intervalo de 0,4-3,4 $\times 10^6$ 1/M. La velocidad de disociación (k_d) está preferentemente en el intervalo de 1-10 $\times 10^{-3}$ 1/s. Estos valores pueden determinarse normalmente mediante resonancia de plasmones superficiales.

Se puede llevar a cabo un ensayo de unión competitiva en el que la unión del anticuerpo a la diana se compara con la unión de la diana por otro ligando conocido de esa diana, tal como otro anticuerpo. La concentración a la que se produce el 50 % de inhibición se conoce como K_i . En condiciones ideales, la K_i es equivalente a la K_d . El valor de K_i nunca será menor que el de la K_d , ya que la medición de la K_i puede sustituirse convenientemente para

proporcionar un límite superior para la Kd.

Un anticuerpo de la invención es capaz preferentemente de unirse a su diana con una afinidad que es al menos dos veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces o mayor que su afinidad por la unión a otra molécula no diana.

5 Un anticuerpo de la invención tendrá normalmente la capacidad para:

- (a) unirse específicamente al CD40 humano cuando se localiza sobre la superficie de una célula; y/o
- 10 (b) aumentar la lisis mediada por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) de una célula que expresa el CD40; y/o
- (c) aumentar la apoptosis de una célula que expresa el CD40; y/o
- (d) modular la actividad de una célula que expresa el CD40, en la que dicha modulación es un aumento o disminución de la actividad de dicha célula; y/o
- 15 (e) bloquear la unión del CD40L al CD40, reducir la unión del CD40L al CD40, o no bloquear ni reducir la unión del CD40L al CD40.

Estas características pueden evaluarse por cualquier método adecuado, tal como los métodos descritos en el presente documento incluyendo en los Ejemplos.

20 Un anticuerpo de la presente divulgación se une normalmente al mismo epítipo que el anticuerpo que tiene las secuencias de SEQ ID NO: 61 y 62; o de SEQ ID NO: 63 y 64; o de SEQ ID NO: 65 y 66; o de SEQ ID NO: 67 y 68; o de SEQ ID NO: 69 y 70; o de SEQ ID NO: 71 y 72; o de SEQ ID NO: 73 y 74; o de SEQ ID NO: 75 y 76; o de SEQ ID NO: 77 y 78; o de SEQ ID NO: 79 y 80. Como se utiliza en el presente documento, el término "epítipo" se refiere en general al sitio de un antígeno diana que es reconocido por un receptor inmunitario tal como un anticuerpo.

25 Preferentemente, es un péptido corto derivado de o que es parte de una proteína. Sin embargo, el término también tiene la intención de incluir péptidos con epítopos glicopeptídicos y de carbohidrato. Una molécula antigénica sencilla, tal como una proteína diana como se describe en el presente documento, puede comprender varios epítopos diferentes. Los epítopos se pueden identificar a partir del conocimiento de las secuencias de aminoácidos y de ADN correspondientes del péptido, así como a partir de la naturaleza de los aminoácidos en particular (por ejemplo, el tamaño, carga, etc.) y el diccionario de codones, sin excesiva experimentación. Véase, por ejemplo, Ivan Roitt, *Essential Immunology*, 1988; Janis Kuby, *Immunology*, 1992 e.g., pp. 79-81.

30

La localización de un epítipo puede identificarse mediante métodos de rutina. Por ejemplo, la localización general de un epítipo puede determinarse evaluando la capacidad de un anticuerpo para unirse a diferentes fragmentos o variantes de los polipéptidos de CD40. Los aminoácidos específicos dentro del CD40 que hacen contacto con un anticuerpo pueden determinarse también utilizando métodos de rutina, tal como los que se describen en los Ejemplos. Por ejemplo, el anticuerpo y la molécula diana pueden combinarse y se puede cristalizar el complejo anticuerpo/diana. Se puede determinar la estructura cristalina del complejo y utilizarse para identificar los sitios específicos de interacción entre el anticuerpo y su diana.

35

40 Un anticuerpo de la invención se puede unir al mismo epítipo o región que otro anticuerpo de la invención. Por ejemplo, cuando se conoce un anticuerpo de la invención, se pueden identificar otros anticuerpos de la invención comparando sus uniones al CD40 con la de otro anticuerpo conocido.

45 Un anticuerpo de la presente divulgación puede ser un anticuerpo que se una al mismo epítipo del CD40 que los anticuerpos descritos en el presente documento que tienen las secuencias de SEQ ID NO: 61 y 62; o de SEQ ID NO: 63 y 64; o de SEQ ID NO: 65 y 66; o de SEQ ID NO: 67 y 68; o de SEQ ID NO: 69 y 70; o de SEQ ID NO: 71 y 72; o de SEQ ID NO: 73 y 74; o de SEQ ID NO: 75 y 76; o de SEQ ID NO: 77 y 78; o de SEQ ID NO: 79 y 80. El anticuerpo de la invención comprende una cadena pesada y una cadena ligera.

50

Un anticuerpo de la invención puede tener la capacidad de competir de manera cruzada con otro anticuerpo de la invención por la unión con el CD40 u otra diana apropiada como se describe en el presente documento. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede competir de manera cruzada con uno o más de los anticuerpos descritos en el presente documento, por ejemplo, un anticuerpo que tenga las secuencias de SEQ ID NO: 61 y 62, por la unión con CD40 o un fragmento adecuado o variante de CD40 que esté unido por los anticuerpos. Dichos anticuerpos de competición cruzada pueden identificarse basándose en su capacidad para competir de manera cruzada con un anticuerpo conocido de la invención en ensayos de unión convencionales. Por ejemplo, se puede utilizar un análisis BIAcore, ensayos ELISA o citometría de flujo para demostrar la competición cruzada. Dicha competición cruzada puede sugerir que los dos anticuerpos se unen al mismo epítipo o similares.

55

60 Un anticuerpo de la invención se puede identificar, por lo tanto, mediante un método que comprende un ensayo de unión que evalúe si un anticuerpo es capaz o no de competir de manera cruzada con un anticuerpo conocido de la invención por un sitio de unión sobre una molécula diana. Los métodos para llevar a cabo ensayos de unión competitiva son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden implicar poner en contacto juntos un anticuerpo conocido de la invención y una molécula diana en condiciones en las que el anticuerpo pueda unirse a la molécula diana. El complejo anticuerpo/diana puede ponerse entonces en contacto con un anticuerpo de ensayo y se puede

65

evaluar la extensión hasta la que el anticuerpo de ensayo es capaz de desplazar el anticuerpo de la invención de los complejos anticuerpo/diana. Un método alternativo puede implicar poner en contacto un anticuerpo de ensayo con una molécula diana en condiciones que permitan la unión del anticuerpo, y luego la adición de un anticuerpo de la invención que es capaz de unirse a esa molécula diana y la evaluación de la extensión hasta la que el anticuerpo de la invención es capaz de desplazar el anticuerpo de ensayo de los complejos anticuerpo/diana.

La capacidad de un anticuerpo de ensayo para inhibir la unión de un anticuerpo de la invención a la diana demuestra que el compuesto de ensayo puede competir con un anticuerpo de la invención por la unión con la diana y por lo tanto que el anticuerpo de ensayo se une al mismo epítipo o región sobre el CD40 proteico que el anticuerpo conocido de la invención. Un anticuerpo de ensayo que se identifica como de competición cruzada con un anticuerpo conocido de la invención en dicho método también es un anticuerpo potencial de acuerdo con la presente invención. El hecho de que el anticuerpo de ensayo pueda unirse al CD40 en la misma región que un anticuerpo conocido de la invención y que compita de manera cruzada con el anticuerpo conocido de la invención sugiere que el anticuerpo de ensayo puede actuar como un ligando del mismo sitio de unión que el anticuerpo conocido y que el anticuerpo de ensayo puede por lo tanto imitar la acción del anticuerpo conocido.

El anticuerpo conocido de la invención puede ser un anticuerpo descrito en el presente documento, tal como los anticuerpos CD40 que se describen en el presente documento o cualquier variante o fragmento del mismo como se describen en el presente documento que mantienen la capacidad para unirse al CD40. Un anticuerpo de la invención puede unirse al mismo epítipo que uno o más de los anticuerpos descritos en el presente documento o cualquier variante o fragmento de los mismos que se describen en el presente documento que mantengan la capacidad de unirse al CD40.

La unión específica puede evaluarse en referencia a la unión del anticuerpo con una molécula que no sea la diana. Se puede hacer la comparación comparando la capacidad de un anticuerpo para unirse a la diana y a la otra molécula. Esta comparación se puede hacer como se ha descrito anteriormente en una evaluación de la K_d o K_i . La otra molécula que se utiliza en dicha comparación puede ser cualquier molécula que no sea la molécula diana. Preferentemente, la otra molécula no es idéntica a la molécula diana. Preferentemente, la molécula diana no es un fragmento de la molécula diana.

El término "anticuerpo" al que se hace referencia en el presente documento incluye los anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión al antígeno (es decir, "la parte de unión al antígeno") o cadenas sencillas del mismo. Un anticuerpo se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro, o una parte de unión al antígeno de la misma. Cada cadena pesada está compuesta normalmente por una región variable de cadena pesada (que se abrevia en el presente documento como VH) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera está compuesta normalmente por una región variable de cadena ligera (que se abrevia en el presente documento como VL) y una región constante de cadena ligera. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones VH y VL se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones marco conservadas (FR). Las regiones constantes de los anticuerpos pueden intervenir en la unión de las inmunoglobulinas a tejidos o factores huéspedes, incluyendo distintas células del sistema inmunitario (tales como las células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

Un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. En una realización, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos policlonales son anticuerpos que se derivan de diferentes líneas de células B. Un anticuerpo policlonal puede comprender una mezcla de diferentes moléculas de inmunoglobulina que se dirigen contra un antígeno específico. El anticuerpo policlonal puede comprender una mezcla de diferentes moléculas de inmunoglobulina que se unen a uno o más epítopos diferentes dentro de una molécula de antígeno. Los anticuerpos policlonales se pueden producir por métodos de rutina tales como la inmunización con el antígeno de interés. Por ejemplo, un ratón capaz de expresar secuencias de anticuerpo humano se puede inmunizar con un CD40 humano. Se retira posteriormente sangre y se purifica la fracción de Ig.

Los anticuerpos monoclonales son moléculas de inmunoglobulina que son idénticas entre ellas y tienen una única especificidad de unión por un epítipo particular. Los anticuerpos monoclonales (mAb) de la presente invención pueden producirse por varias técnicas, que incluyen la metodología de anticuerpos monoclonales convencional, por ejemplo, las desveladas en "Monoclonal Antibodies; A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) y en "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Application", SGR Hurrell (CRC Press, 1982).

La expresión "parte de unión al antígeno" de un anticuerpo se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que mantienen la capacidad para unirse específicamente a un antígeno, tal como el CD40. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo se puede llevar a cabo mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión englobados dentro de la expresión "parte de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento Fab', un fragmento Fd, un fragmento Fv, un fragmento dAb y una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Los anticuerpos

de cadena sencilla tales como un scFv y anticuerpos de cadena pesada tales como VHH y anticuerpos de camélidos también se pretenden englobar dentro de la expresión "parte de unión al antígeno" del anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se pueden explorar en cuanto a su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

5 Un anticuerpo de la presente invención se puede preparar, expresar, crear o aislar por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que sea transgénico o transcromosómico para los genes de inmunoglobulina de interés o un hibridoma preparado a partir de este, (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para que exprese en anticuerpo de interés, por ejemplo, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados a partir de una biblioteca de anticuerpos recombinantes o combinatoriales, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por otros medios que impliquen el corte y empalme de secuencias genéticas de inmunoglobulina con otras secuencias de ADN.

15 Un anticuerpo de la invención es un anticuerpo humano. La expresión "anticuerpo humano", como se utiliza en el presente documento, tiene la intención de incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones marco conservadas como las CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, las mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se utiliza en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamífero, tales como un ratón, se han injertado en las secuencias marco conservadas humanas.

25 Dicho anticuerpo humano puede ser un anticuerpo monoclonal humano. Dicho anticuerpo monoclonal humano se puede producir mediante un hibridoma que incluye una célula B obtenida a partir de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tenga un genoma que comprenda un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera, que se fusiona con una célula inmortalizada.

30 Los anticuerpos humanos se pueden preparar mediante la inmunización *in vitro* de linfocitos humanos seguido por la transformación de los linfocitos con un virus de Epstein-Barr.

La expresión "derivados de anticuerpo humano" se refiere a cualquier forma modificada de un anticuerpo humano, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

35 Los anticuerpos de la invención se pueden ensayar en cuanto a la unión a la proteína diana, por ejemplo, mediante ELISA convencional o transferencia de Western. También se puede utilizar un ensayo ELISA para explorar los hibridomas que presenten una reactividad positiva con la proteína diana. La especificidad de unión de un anticuerpo también se puede determinar monitorizando la unión del anticuerpo a las células que expresan la proteína diana, por ejemplo, mediante citometría de flujo.

40 La especificidad de un anticuerpo de la invención por la proteína diana puede estudiarse adicionalmente determinando si el anticuerpo se une o no a otras proteínas. Por ejemplo, cuando se desee producir un anticuerpo que se una específicamente al CD40 o una parte en particular, por ejemplo, el epítipo, de CD40, se puede evaluar la especificidad del anticuerpo determinando si el anticuerpo se une también o no a otras moléculas o formas modificadas del CD40 que carecen de la parte de interés.

50 Una vez que se ha identificado y seleccionado el anticuerpo adecuado, se puede identificar la secuencia de aminoácidos del anticuerpo mediante métodos conocidos en la técnica. Los genes que codifican el anticuerpo se pueden clonar utilizando cebadores degenerados. El anticuerpo puede producirse recombinantemente mediante métodos de rutina.

Un "polipéptido" se utiliza en el presente documento en su sentido más amplio para referirse a un compuesto con dos o más subunidades de aminoácidos, análogos de aminoácidos, u otros peptidomiméticos. El término "polipéptido" incluye por tanto secuencias peptídicas cortas y también polipéptidos más largos y proteínas. Como se utiliza en el presente documento, el término "aminoácido" se refiere a los aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, incluyendo la glicina y ambos isómeros ópticos D y L, y análogos de aminoácidos y peptidomiméticos.

60 Los presentes inventores han identificado anticuerpos como se describe en los ejemplos. La presente divulgación engloba estos anticuerpos y las variantes y fragmentos de los mismos que mantengan una o más actividades de estos anticuerpos. Las actividades de estos anticuerpos incluyen la capacidad para unirse al CD40, y la capacidad para unirse al CD40 humano cuando se expresa en la superficie de una célula.

65 Un fragmento o variante adecuados de este anticuerpo mantendrá la capacidad para unirse al CD40. Preferentemente mantendrá la capacidad para unirse al CD40 específicamente. Preferentemente mantendrá la capacidad para unirse específicamente al mismo epítipo o región de la molécula de CD40 que el anticuerpo, por

ejemplo, un anticuerpo que tenga la secuencia de SEQ ID NO: 61 y 62, del que se deriva. También mantendrá una o más funciones adicionales del anticuerpo del que se deriva, tales como la capacidad para:

- 5 (a) unirse específicamente al CD40 humano cuando se localiza sobre la superficie de una célula; y/o
- (b) aumentar la lisis mediada por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) de una célula que expresa el CD40; y/o
- (c) aumentar la apoptosis de una célula que expresa el CD40; y/o
- (d) modular la actividad de una célula que expresa el CD40, en la que dicha modulación es un aumento o
- 10 (e) bloquear la unión del CD40L al CD40, reducir la unión del CD40L al CD40, o no bloquear ni reducir la unión del CD40L al CD40.

15 Los "fragmentos" de polipéptido o anticuerpo de acuerdo con la invención se pueden producir mediante truncado, por ejemplo, retirando uno o más aminoácidos de los extremos N o C de un polipéptido. Se pueden retirar hasta 10, hasta 20, hasta 30, hasta 40 o más aminoácidos del extremo N y/o C de esta manera. Los fragmentos también se pueden generar mediante una o más eliminaciones internas.

20 Un anticuerpo de la invención puede ser, o puede comprender, un fragmento de los anticuerpos o una variante de los mismos. El anticuerpo de la invención puede ser o puede comprender, una parte de unión al antígeno de estos anticuerpos o una variante de los mismos como se ha expuesto anteriormente. Por ejemplo, el anticuerpo de la invención puede ser un fragmento Fab de uno de estos anticuerpos o una variante de los mismos o puede ser un anticuerpo de cadena sencilla derivado de uno de estos anticuerpos o una variante de los mismos.

25 Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada o ligera de otro anticuerpo de la invención se dan en las SEQ ID NO: 61 y 62. Las CDR de la cadena VH se muestran en las SEQ ID NO: 1, 2 y 3. Las CDR de la cadena VL se muestran en las SEQ ID NO: 4, 5 y 6.

30 Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada o ligera de otro anticuerpo de la presente divulgación se dan en las SEQ ID NO: 63 y 64. Las CDR de la cadena VH se muestran en las SEQ ID NO: 7, 8 y 9. Las CDR de la cadena VL se muestran en las SEQ ID NO: 10, 11 y 12.

35 Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada o ligera de otro anticuerpo de la invención se dan en las SEQ ID NO: 65 y 66. Las CDR de la cadena VH se muestran en las SEQ ID NO: 13, 14 y 15. Las CDR de la cadena VL se muestran en las SEQ ID NO: 16, 17 y 18.

40 Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada o ligera de otro anticuerpo de la invención se dan en las SEQ ID NO: 67 y 68. Las CDR de la cadena VH se muestran en las SEQ ID NO: 19, 20 y 21. Las CDR de la cadena VL se muestran en las SEQ ID NO: 22, 23 y 24.

45 Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada o ligera de otro anticuerpo de la presente divulgación se dan en las SEQ ID NO: 69 y 70. Las CDR de la cadena VH se muestran en las SEQ ID NO: 25, 26 y 27. Las CDR de la cadena VL se muestran en las SEQ ID NO: 28, 29 y 30.

Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada o ligera de otro anticuerpo de la presente divulgación se dan en las SEQ ID NO: 71 y 72. Las CDR de la cadena VH se muestran en las SEQ ID NO: 31, 32 y 33. Las CDR de la cadena VL se muestran en las SEQ ID NO: 34, 35 y 36.

50 Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada o ligera de otro anticuerpo de la invención se dan en las SEQ ID NO: 73 y 74. Las CDR de la cadena VH se muestran en las SEQ ID NO: 37, 38 y 39. Las CDR de la cadena VL se muestran en las SEQ ID NO: 40, 41 y 42.

55 Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada o ligera de otro anticuerpo de la presente divulgación se dan en las SEQ ID NO: 75 y 76. Las CDR de la cadena VH se muestran en las SEQ ID NO: 43, 44 y 45. Las CDR de la cadena VL se muestran en las SEQ ID NO: 46, 47 y 48.

Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada o ligera de otro anticuerpo de la presente divulgación se dan en las SEQ ID NO: 77 y 78. Las CDR de la cadena VH se muestran en las SEQ ID NO: 49, 50 y 51. Las CDR de la cadena VL se muestran en las SEQ ID NO: 52, 53 y 54.

60 Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada o ligera de otro anticuerpo de la presente divulgación se dan en las SEQ ID NO: 79 y 80. Las CDR de la cadena VH se muestran en las SEQ ID NO: 55, 56 y 57. Las CDR de la cadena VL se muestran en las SEQ ID NO: 58, 59 y 60.

65 Un anticuerpo de la presente divulgación puede comprender la secuencia de aminoácidos de VH de SEQ ID NO: 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, o 79, o un fragmento o variante de cualquiera de ellas. Un anticuerpo de la presente divulgación puede comprender la secuencia de aminoácidos de VL de SEQ ID NO: 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78,

u 80, o un fragmento o variante de cualquiera de ellas.

Un anticuerpo de la invención puede comprender tanto (a) la secuencia de aminoácidos de VH de SEQ ID NO: 61, o un fragmento o variante de la misma como (b) la secuencia de aminoácidos de VL de SEQ ID NO: 62, o un fragmento o variante de la misma.

De manera alternativa, un anticuerpo de la presente divulgación puede comprender tanto (a) la secuencia de aminoácidos de VH de SEQ ID NO: 63, o un fragmento o variante de la misma como (b) la secuencia de aminoácidos de VL de SEQ ID NO: 64, o un fragmento o variante de la misma.

De manera alternativa, un anticuerpo de la invención puede comprender tanto (a) la secuencia de aminoácidos de VH de SEQ ID NO: 65, o un fragmento o variante de la misma como (b) la secuencia de aminoácidos de VL de SEQ ID NO: 66, o un fragmento o variante de la misma.

De manera alternativa, un anticuerpo de la invención puede comprender tanto (a) la secuencia de aminoácidos de VH de SEQ ID NO: 67, o un fragmento o variante de la misma como (b) la secuencia de aminoácidos de VL de SEQ ID NO: 68, o un fragmento o variante de la misma.

De manera alternativa, un anticuerpo de la presente divulgación puede comprender tanto (a) la secuencia de aminoácidos de VH de SEQ ID NO: 69, o un fragmento o variante de la misma como (b) la secuencia de aminoácidos de VL de SEQ ID NO: 70, o un fragmento o variante de la misma.

De manera alternativa, un anticuerpo de la presente divulgación puede comprender tanto (a) la secuencia de aminoácidos de VH de SEQ ID NO: 71, o un fragmento o variante de la misma como (b) la secuencia de aminoácidos de VL de SEQ ID NO: 72, o un fragmento o variante de la misma.

De manera alternativa, un anticuerpo de la invención puede comprender tanto (a) la secuencia de aminoácidos de VH de SEQ ID NO: 73, o un fragmento o variante de la misma como (b) la secuencia de aminoácidos de VL de SEQ ID NO: 74, o un fragmento o variante de la misma.

De manera alternativa, un anticuerpo de la presente divulgación puede comprender tanto (a) la secuencia de aminoácidos de VH de SEQ ID NO: 75, o un fragmento o variante de la misma como (b) la secuencia de aminoácidos de VL de SEQ ID NO: 76, o un fragmento o variante de la misma.

De manera alternativa, un anticuerpo de la presente divulgación puede comprender tanto (a) la secuencia de aminoácidos de VH de SEQ ID NO: 77, o un fragmento o variante de la misma como (b) la secuencia de aminoácidos de VL de SEQ ID NO: 78, o un fragmento o variante de la misma.

De manera alternativa, un anticuerpo de la presente divulgación puede comprender tanto (a) la secuencia de aminoácidos de VH de SEQ ID NO: 79, o un fragmento o variante de la misma como (b) la secuencia de aminoácidos de VL de SEQ ID NO: 80, o un fragmento o variante de la misma.

Un anticuerpo de la presente divulgación puede comprender un fragmento de una de las secuencias de aminoácidos de VL o VH que se muestran anteriormente. Por ejemplo, un anticuerpo de la presente divulgación puede comprender un fragmento de al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 12, al menos 15, al menos 18, al menos 20 o al menos 25 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia de aminoácidos de VL o VH. Dicho fragmento mantendrá preferentemente una o más de las funciones expuestas anteriormente, tal como la capacidad de unirse al CD40.

Los identificadores SEQ ID NO de las secuencias de los anticuerpos específicos identificados en el presente documento se resumen en la Tabla 1.

TABLA 1

Anticuerpo	CADENA PESADA				
	CDR1	CDR2	CDR3	Región variable (proteína)	Región variable (nucleótido)
1146/1147	1	2	3	61	81
1142/1135	7	8	9	63	83
1132/1133	13	14	15	65	85
1148/1149	19	20	21	67	87
1138/1135	25	26	27	69	89
1134/1135	31	32	33	71	91
1136/1137	37	38	39	73	93
1140/1135	43	44	45	75	95
1150/1151	49	50	51	77	97
1107/1108	55	56	57	79	99

(continuación)

Anticuerpo	CADENA LIGERA				
	CDR1	CDR2	CDR3	Región variable (proteína)	Región variable (nucleótido)
1146/1147	4	5	6	62	82
1142/1135	10	11	12	64	84
1132/1133	16	17	18	66	86
1148/1149	22	23	24	68	88
1138/1135	28	29	30	70	90
1134/1135	34	35	36	72	92
1136/1137	40	41	42	74	94
1140/1135	46	47	48	76	96
1150/1151	52	53	54	78	98
1107/1108	58	59	60	80	100

Un anticuerpo de la presente divulgación puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis secuencias de CDR de uno cualquiera de los anticuerpos identificados en el presente documento, por ejemplo, uno cualquiera de los anticuerpos 1146/1147, 1142/1135, 1132/1133, 1148/1149, 1138/1135, 1134/1135, 1136/1137, 1140/1135, 1150/1151 y 1107/1108 que se enumeran en la Tabla 1. Dicho anticuerpo tendrá preferentemente una o más de las funciones descritas en el presente documento. Por ejemplo, el anticuerpo puede:

- (a) unirse específicamente al CD40 humano cuando se localiza sobre la superficie de una célula; y/o
- (b) aumentar la lisis mediada por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) de una célula que expresa el CD40; y/o
- (c) aumentar la apoptosis de una célula que expresa el CD40; y/o
- (d) modular la actividad de una célula que expresa el CD40, en la que dicha modulación es un aumento o disminución de la actividad de dicha célula; y/o
- (e) bloquear la unión del CD40L al CD40, reducir la unión del CD40L al CD40, o no bloquear ni reducir la unión del CD40L al CD40.

Un anticuerpo de la presente divulgación puede comprender una o más secuencias de CDR de uno cualquiera de los anticuerpos específicos que se muestran en la Tabla 1. Un anticuerpo de la presente divulgación puede comprender una o más secuencias de CDR de la cadena pesada y alternativa o adicionalmente una o más secuencias de CDR de la cadena ligera de dicho anticuerpo específico. Un anticuerpo de la presente divulgación puede comprender una, dos o las tres secuencias de CDR de la cadena pesada de un anticuerpo específico que se muestra en la Tabla 1 y alternativa o adicionalmente una, dos o las tres secuencias de CDR de la cadena ligera de dicho anticuerpo específico. Un anticuerpo de la invención comprende la seis secuencias de CDR de un anticuerpo específico que se muestra en la Tabla 1. A modo de ejemplo, cuando el anticuerpo específico de la Tabla 1 es el anticuerpo 1146/1147, un anticuerpo de la invención comprende las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Un anticuerpo de la presente divulgación puede comprender una, dos o las tres de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y/o una, dos o las tres de las SEQ ID NO: 4, 5 y 6. Un anticuerpo de la invención puede comprender las seis de las SEQ ID NO: 1 a 6.

Un anticuerpo de la presente divulgación puede ser de manera alternativa o puede comprender una variante de una de estas secuencias específicas. Por ejemplo, una variante puede ser una variante de sustitución, eliminación o adición de cualquiera de las secuencias de aminoácidos anteriores.

Una variante de anticuerpo puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, hasta 10, hasta 20, hasta 30 o más sustituciones y/o eliminaciones de aminoácidos a partir de las secuencias específicas y fragmentos expuestos anteriormente. Las variantes de "eliminación" pueden comprender la eliminación de aminoácidos individuales, la eliminación de pequeños grupos de aminoácidos tales como 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, o la eliminación de regiones de aminoácidos mayores, tales como la eliminación de dominios de aminoácidos específicos u otras características. Las variantes de "sustitución" implican preferentemente la sustitución de uno o más aminoácidos por el mismo número de aminoácidos y se hacen sustituciones de aminoácidos conservadoras. Por ejemplo, un aminoácido se puede sustituir por un aminoácido alternativo que tenga propiedades similares, por ejemplo, otro aminoácido básico, otro aminoácido ácido, otro aminoácido neutro, otro aminoácido cargado, otro aminoácido hidrofílico, otro aminoácido hidrofóbico, otro aminoácido polar, otro aminoácido aromático u otro aminoácido alifático. Algunas de las propiedades de los 20 aminoácidos principales que se pueden utilizar para seleccionar sustituyentes adecuados son las siguientes:

Ala	alifático, hidrofóbico, neutro	Met	hidrofóbico, neutro
Cys	polar, hidrofóbico, neutro	Asn	polar, hidrofílico, neutro
Asp	polar, hidrofílico, cargado (-)	Pro	hidrofóbico, neutro
Glu	polar, hidrofílico, cargado (-)	Gln	polar, hidrofílico, neutro
Fe	aromático, hidrofóbico, neutro	Arg	polar, hidrofílico, cargado (+)
Gly	alifático, neutro	Ser	polar, hidrofílico, neutro

(continuación)

His	aromático, polar, hidrofílico, cargado (+)	Thr	polar, hidrofílico, neutro
Ile	alifático, hidrofóbico, neutro	Val	alifático, hidrofóbico, neutro
Lys	polar, hidrofílico, cargado(+)	Trp	aromático, hidrofóbico, neutro
Leu	alifático, hidrofóbico, neutro	Tyr	aromático, polar, hidrofóbico

5 Los "derivados" o "variantes" preferidos incluyen los que, en vez del aminoácido de origen natural, el aminoácido que aparece en la secuencia es un análogo estructural del mismo. Los aminoácidos que se utilizan en las secuencias también pueden derivarse o modificarse, por ejemplo, marcarse, a condición de que la función del anticuerpo no se afecte de manera significativamente adversa.

10 Los derivados y variantes que se describen anteriormente pueden prepararse durante la síntesis del anticuerpo o mediante una modificación tras la producción, o cuando el anticuerpo está en forma recombinante utilizando las técnicas conocidas de mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis aleatoria, o escisión enzimática y/o ligadura de ácidos nucleicos.

15 Preferentemente, las variantes de anticuerpo de acuerdo con la invención tienen una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 o 95 % de identidad de aminoácidos con el dominio VL o VH, o un fragmento de los mismos, de un anticuerpo desvelado en el presente documento. Este nivel de identidad de aminoácidos se puede ver a lo largo de la longitud completa de la secuencia relevante de SEQ ID NO o sobre una parte de la secuencia, tal como a través de 20, 30, 50, 75, 100, 150, 200 o más aminoácidos, dependiendo del tamaño del polipéptido de longitud completa.

20 En conexión con las secuencias de aminoácidos, "identidad de secuencia" se refiere a secuencias que tienen el valor establecido cuando se evalúan utilizando ClustalW (Thompson et al., 1994, *supra*) con los siguientes parámetros:

25 Parámetros de alineamiento por pareja - Método: preciso, Matriz: PAM, Penalización de hueco abierto: 10,00, Penalización de extensión de hueco: 0,10;
 30 Parámetros de alineamiento múltiple - Matriz: PAM, Penalización de hueco abierto: 10,00, % de identidad por retraso: 30, Penalización huecos terminales: on, Distancia de separación de huecos: 0, Matriz negativa: no, Penalización de extensión de huecos: 0,20, Penalizaciones por hueco específico del resto: on, Penalizaciones por hueco hidrofílico: on, restos hidrofílicos: GPSNDQEKR. La identidad de secuencia en un resto particular tiene la intención de incluir restos idénticos que simplemente se han derivado.

35 La presente invención proporciona por lo tanto anticuerpos que tienen secuencias de aminoácidos de VH y VL específicas y variantes y fragmentos de los mismos que mantengan la función o actividad de estos dominios VH y VL.

En consecuencia, un anticuerpo de la presente divulgación puede comprender:

40 (a) una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: Las SEQ ID NO: 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77 o 79;
 (b) un fragmento de al menos 7 aminoácidos de (a), en el que el anticuerpo mantiene la capacidad de unirse específicamente al CD40; o
 (c) una variante de (a), que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de (a), en el que el anticuerpo mantiene la capacidad de unirse específicamente al CD40.

45 Un anticuerpo de la presente divulgación puede comprender:

50 (a) una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 o 80;
 (b) un fragmento de al menos 7 aminoácidos de (a), en el que el anticuerpo mantiene la capacidad de unirse específicamente al CD40; o
 (c) una variante de (a), que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de (a), en el que el anticuerpo mantiene la capacidad de unirse específicamente al CD40.

55 Un anticuerpo de la presente divulgación puede comprender:

60 (a) la región variable de cadena pesada y la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo específico como se desvela en la Tabla 1;
 (b) una variante de (a) en la que una o ambas secuencias de cadena pesada y cadena ligera están modificadas de manera que comprende un fragmento de al menos 7 aminoácidos de la secuencia especificada en (a); o
 (c) una variante de (a) o (b) en el que una o ambas secuencias de cadena pesada y cadena ligera se modifica de

manera que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de (a) o (b);

en el que el anticuerpo mantiene la capacidad para unirse al CD40 específicamente.

5 A modo de ejemplo, cuando el anticuerpo específico de la Tabla 1 es el anticuerpo denominado 1146/1147, un anticuerpo de la invención puede comprender:

(a) la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 61 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 62;

10 (b) una variante de (a) en la que una o ambas secuencias de cadena pesada y cadena ligera están modificadas de manera que comprende un fragmento de al menos 7 aminoácidos de la secuencia especificada en (a); o

(c) una variante de (a) o (b) en el que una o ambas secuencias de cadena pesada y cadena ligera se modifica de manera que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de (a) o (b);

15 en el que el anticuerpo mantiene la capacidad para unirse al CD40 específicamente.

Como se ha explicado anteriormente, un anticuerpo de la invención se puede unir al mismo epítipo o región que otro anticuerpo de la invención. Por lo tanto, se verá que dicho anticuerpo puede unirse al mismo epítipo o región del CD40 que cualquiera de los anticuerpos específicos, fragmentos y variantes descritos en el presente documento.

20 Se prefiere que una alta proporción del anticuerpo o fragmento de la invención se mantendrá dentro de un microentorno tumoral *in vivo* durante un extenso periodo de tiempo después de la administración de dicho anticuerpo o fragmento en un sitio tumoral. Es decir, se prefiere que el anticuerpo o fragmento presente una fuga reducida del sitio del tumor en la circulación vascular o linfática. Preferentemente, al menos un 30 % de la dosis de anticuerpo administrada en el sitio de un tumor se mantiene en el sitio del tumor a las cuatro horas después de la administración, más preferentemente al menos un 40 % de la dosis se mantiene a las cuatro horas después de la administración y más preferentemente al menos un 50 % de la dosis se mantiene a las cuatro horas después de la administración. La retención del anticuerpo en un microentorno tumoral puede estudiarse inyectando el anticuerpo en tumores de modelos murinos y midiendo los niveles séricos del anticuerpo a lo largo del tiempo después de la administración. De manera alternativa, la distribución del anticuerpo se puede medir utilizando anticuerpos radiomarcados inyectados en los tumores de modelos murinos.

35 El pH en el microentorno tumoral *in vivo* es significativamente más ácido que el de los tejidos sanos. Se han publicado intervalos en los tumores alrededor de un pH de 6,5 a 7,2 o 6,6 a 7,0, en comparación con 7,2 a 7,4 de los tejidos sanos. Esta acidez es debida primariamente a la glicólisis anaeróbica en las regiones tumorales sometidas a hipoxia de corto plazo o largo plazo como resultado del sistema vascular poco organizado con un flujo sanguíneo caótico disminuido, y la glicólisis aeróbica (el efecto Warburg), una propiedad fenotípica del cáncer común en la que las rutas metabólicas glicolíticas se utilizan incluso en presencia de oxígeno. Debido a esta acidez, se prefiere que el anticuerpo de la invención tenga un punto isoeléctrico alto debido a que este dará lugar a una retención mejorada en el microentorno tumoral con respecto a un anticuerpo similar con un punto isoeléctrico menor.

40 El punto isoeléctrico de un anticuerpo puede determinarse mediante cualquier método adecuado. Se puede determinar *in vitro*, por ejemplo, mediante métodos electroforéticos. De manera alternativa, se puede calcular el punto isoeléctrico a partir de principios básicos. En este caso, se hace referencia al punto isoeléctrico resultante como el punto isoeléctrico teórico. Existen numerosos programas de software para el cálculo *in silico* del punto isoeléctrico teórico, por ejemplo, GP-MAW (versión 9.2, de Lighthouse Data). Un anticuerpo de la invención tiene preferentemente un punto isoeléctrico (pI) teórico de 9,0 o por encima, preferentemente de 9,1 o por encima, más preferentemente de 9,2 o por encima, más preferentemente de 9,25 o por encima.

50 Los anticuerpos de la presente divulgación pueden dividirse normalmente en tres grupos o clases con diferentes perfiles de unión al receptor del CD40, basándose en su capacidad para competir con el CD40L por la unión con el CD40. La competición entre un anticuerpo y el CD40L por la unión con el CD40 puede evaluarse mediante cualquier método adecuado tal como los que se describen en el presente documento incluyendo en los Ejemplos.

55 La primera clase de los clones de anticuerpo, denominada CDRH3A, incluye el clon 1107/1108. Los anticuerpos de esta clase bloquean completamente la unión del CD40L al CD40. Se unen a un epítipo próximo al sitio de unión del CD40L, y/o se unen al CD40 de una manera que afecta al sitio de unión del CD40L en el CD40 induciendo cambios conformacionales. Los anticuerpos de esta clase comprenden normalmente un dominio de unión que se une al módulo A del dominio 2 del CD40 humano.

60 La segunda clase de clones de anticuerpo, denominada CDRH3B, incluye 1140/1135, 1138/1135, 1134/1135, 1142/1135. Los anticuerpos de esta clase no bloquean la unión del CD40L al CD40, y por lo tanto se unen en un epítipo separado distinto del sitio de unión del CD40L y la clase CDRH3A. La clase CDRH3B comparte una CDRH3 común de 12 aminoácidos de longitud, y una secuencia bucle de consenso de A, R, G, P, F/V/A, Y, S, S/T, V/Y/F, F/I/L, D, Y. Además, la clase CDRH3B tiene las regiones CDRL3 y CDRH1 en común. Los anticuerpos de esta clase se unen normalmente al módulo B del dominio 3 del CD40 humano.

65

- La tercera clase de clones de anticuerpo, denominada CDRH3C, incluye 1148/1149, 1132/1133, 1146/1147, y 1136/1137. Los anticuerpos de esta clase presentan una competición media con CD40L (es decir, reducen la unión del CD40L al CD40), y se unen a un epítipo que se solapa parcialmente con el del CD40L o afectan parcialmente la unión del CD40L al CD40 induciendo cambios conformacionales. Esta clase tiene una secuencia de consenso en CDRH3 que contiene un motivo FG. Los aminoácidos de consenso, en las posiciones 105-117, son A, R, A/Y/R, V, -/N, F, G, F/M/I, D, Y. El tamaño del bucle CDRH3 de consenso es de 9 o 10 aminoácidos. Los anticuerpos de esta clase se unen normalmente al módulo B del dominio 1 del CD40 humano.
- Por lo tanto, cada una de las tres clases CDRH3A-C representa las propiedades ventajosas de la unión al CD40 que pueden complementarse entre ellas, por ejemplo, en la terapia del cáncer. Una terapia basada en una mezcla de clases de anticuerpos CDRH3A-C puede inducir un fuerte y potencialmente sinérgico agrupamiento con CD40, dando como resultado el potencial para producir un potente efecto antitumoral. La mezcla puede consistir en dos o las tres clases de anticuerpos desveladas. En consecuencia, la invención proporciona también una composición que comprende al menos un primer anticuerpo, o fragmento del mismo; y un segundo anticuerpo, o fragmento del mismo, en el que cada anticuerpo es de una clase diferente que se selecciona de entre CDRH3A, CDRH3B y CDRH3C. Por ejemplo, la composición puede comprender un anticuerpo de clase CDRH3B y un anticuerpo de clase CDRH3C. La invención proporciona también una composición que comprende al menos un primer anticuerpo, o fragmento del mismo; y un segundo anticuerpo, o fragmento del mismo; y un tercer anticuerpo, o fragmento del mismo, en el que cada anticuerpo es de una clase diferente que se selecciona de entre CDRH3A, CDRH3B y CDRH3C. Cualquiera de dicha composición puede utilizarse en el tratamiento del cáncer. Dicha composición puede incluir adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. La mezcla óptima de clases CDRH3A, B y C se pueden ensayar mediante el ensayo de potencia en la proliferación de células B. Los métodos adecuados para el ensayo de la potencia en la proliferación de células B se desvelan en los Ejemplos.
- La invención también se refiere a polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la invención. Por lo tanto, un polinucleótido de la invención puede codificar cualquier anticuerpo que se describe en el presente documento. Las expresiones "molécula de ácido nucleico" y "polinucleótido" se utilizan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Ejemplos no limitantes de polinucleótidos incluyen un gen, un fragmento de un gen, un ARN mensajero (ARNm), un ADNc, polinucleótido recombinantes, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico, y cebadores. Un polinucleótido de la invención puede proporcionarse en forma aislada o purificada.
- Una secuencia de ácido nucleico que "codifica" un polipéptido seleccionado es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso del ADN) y se traduce (en el caso de ARN) en un polipéptido *in vivo* cuando se sitúan bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codón de partida en el extremo 5' (amino) y un codón de parada de traducción en el extremo 3' (carboxilo). Para los fines de la invención, dichas secuencias de ácido nucleico pueden incluir, pero no se limitan a, ADNc de un ARNm vírico, de procarionota o eucariota, secuencias genómicas de ADN o ARN vírico o de procarionota, e incluso secuencias de ADN sintético. Se puede localizar una secuencia de terminación de la transcripción en 3' de la secuencia codificante.
- En una realización, un polinucleótido de la presente divulgación comprende una secuencia que codifica una secuencia de aminoácidos de VH o VL como se ha descrito anteriormente. El polinucleótido puede codificar la secuencia de VH o VL de un anticuerpo específico como se desvela en la Tabla 1. Por ejemplo, un polinucleótido de la solicitud puede codificar un polipéptido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77 o 79; o puede codificar un polipéptido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, o 80, o una variante o fragmento de cualquiera de ellas como se ha descrito anteriormente. Un polinucleótido de la presente invención puede codificar ambas secuencias de SEQ ID NO: 61 y 62; SEQ ID NO: 63 y 64; SEQ ID NO: 65 y 66; SEQ ID NO: 67 y 68; SEQ ID NO: 69 y 70; SEQ ID NO: 71 y 72; SEQ ID NO: 73 y 74; SEQ ID NO: 75 y 76; SEQ ID NO: 77 y 78; SEQ ID NO: 79 y 80.
- Dicho polipéptido puede consistir o comprender una secuencia de ácido nucleico de una cualquiera de las SEQ ID NO: 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97 o 99; o las SEQ ID NO: 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98 o 100. Un polinucleótido de la presente divulgación puede comprender o consistir en ambas secuencias de SEQ ID NO: 81 y 82; SEQ ID NO: 83 y 84; SEQ ID NO: 85 y 86; SEQ ID NO: 87 y 88; SEQ ID NO: 89 y 90; SEQ ID NO: 91 y 92; SEQ ID NO: 93 y 94; SEQ ID NO: 95 y 96; SEQ ID NO: 97 y 98; SEQ ID NO: 99 y 100.
- Una secuencia de polinucleótido adecuada puede ser alternativamente una variante de estas secuencias de polinucleótido específicas. Por ejemplo, una variante puede ser una variante de sustitución, eliminación o adición de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico anteriores. Una variante de polinucleótido puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, hasta 10, hasta 20, hasta 30, hasta 40, hasta 50, hasta 75 o más sustituciones y/o eliminaciones de ácido nucleico de las secuencias que se dan en el listado de secuencias.
- Las variantes adecuadas pueden ser al menos un 70 % homólogas respecto a un polinucleótido de una cualquiera de las secuencias de ácido nucleico que se desvelan en la Tabla 1, preferentemente al menos un 80 o un 90 % y

más preferentemente al menos un 95 %, 97 %, o 99 % homólogas de estas. Preferentemente la homología e identidad a estos niveles estará presente al menos con respecto a las regiones codificantes de los polinucleótidos. Los métodos de medición de la homología son bien conocidos en la técnica y los expertos en la técnica entenderán que, en el presente contexto, la homología se calcula basándose en la identidad del ácido nucleico. Dicha homología puede existir en una región de al menos 15, preferentemente al menos 30, por ejemplo, al menos 40, 60, 100, 200 o más nucleótidos contiguos. Dicha homología puede existir sobre la longitud completa de la secuencia de polinucleótido no modificada.

Los métodos de medición de la homología o identidad de polinucleótidos se conocen en la técnica. Por ejemplo, el Paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que se puede utilizar para calcular la homología (por ejemplo, que se utiliza con sus ajustes por defecto) (Devereux et al (1984) Nucleic Acids Research 12, p387-395).

Los algoritmos PILEUP y BLAST también se pueden utilizar para calcular la homología o secuencias alineadas (normalmente con sus ajustes por defecto), por ejemplo, como se describen en Altschul S.F. (1993) J Mol Evol 36:290-300; Altschul, S, F et al (1990) J Mol Biol 215:403-10.

El software para llevar a cabo el análisis BLAST está disponible públicamente mediante el Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica primero la identificación de pares de secuencia de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que coincidan o satisfagan algunas puntuaciones de umbral T valoradas como positivas cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. Se hace referencia a T como la puntuación de umbral de la vecindad de palabras (Altschul et al, *supra*). Estos hitos de palabra de la vecindad inicial actúan como siembra para iniciar las búsquedas para encontrar HSP que las contengan. Los hitos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia para que se puede aumentar la puntuación de alineamiento acumulada. Las extensiones de los hitos de palabras en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineamiento acumulada llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se alcance el final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLAST utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, los alineamientos (B) de la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919) de 50, la esperanza (E) de 10, M = 5, N = 4 y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST lleva a cabo un análisis estadístico de similitud entre dos secuencias; véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787. Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de la suma menor (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos ocurriría por casualidad. Por ejemplo, se considera que una secuencia es similar a otra secuencia si la probabilidad de suma menor al comparar la primera secuencia con la segunda secuencia es menor de aproximadamente 1, preferentemente menos de aproximadamente 0,1, más preferentemente menos de aproximadamente 0,01, y más preferentemente menos de aproximadamente 0,001.

El homólogo puede diferenciarse de una secuencia en el polinucleótido relevante por menos de 3, 5, 10, 15, 20 o más mutaciones (cada una de las cuales puede ser una sustitución, eliminación o inserción). Estas mutaciones pueden medirse sobre una región de al menos 30, por ejemplo, al menos 40, 60 o 100 o más nucleótidos contiguos del homólogo.

En una realización, una variante de secuencia puede variar de las secuencias específicas que se dan en el listado de secuencias gracias a la redundancia del código genético. El código de ADN tiene 4 restos de ácido nucleico primarios (A, T, C y G) y utiliza estos para "escribir" codones de tres letras que representan los aminoácidos de las proteínas codificadas en los genes del organismo. La secuencia lineal de los codones a lo largo de la molécula de ADN se traduce en la secuencia lineal de aminoácidos en las proteínas codificadas por estos genes. El código está altamente degenerado, con 61 codones que codifican los 20 aminoácidos naturales y 3 codones que representan las señales de "parada". Por lo tanto, los aminoácidos son codificados por más de un codón - de hecho, varios son codificados por cuatro o más codones diferentes. Una variante de polinucleótido de la invención puede codificar, por lo tanto, la misma secuencia de polipéptido que otro polinucleótido de la invención, pero puede tener una secuencia de ácido nucleico diferente debido al uso de diferentes codones para codificar los mismos aminoácidos.

Los "fragmentos" de polinucleótido de acuerdo con la invención se pueden producir mediante truncado, por ejemplo, retirando uno o más nucleótidos de uno o ambos extremos de un polinucleótido. Se pueden retirar hasta 10, hasta 20, hasta 30, hasta 40, hasta 50, hasta 75, hasta 100, hasta 200 o más aminoácidos del extremo 3' y/o 5' del polinucleótido de esta manera. Los fragmentos también se pueden generar mediante una o más eliminaciones internas. Dichos fragmentos se pueden derivar de una secuencia de SEQ ID NO: 2 y 8 o se pueden derivar de una variante de polinucleótido como se describe en el presente documento. Preferentemente, dichos fragmentos tienen entre 30 y 300 restos de longitud, por ejemplo, de 30 a 300, de 30 a 100, de 100 a 200, o de 200 a 300 restos. De manera alternativa, los fragmentos de la invención pueden ser secuencias más largas, por ejemplo, que comprendan al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o al menos un 90 % de un

polinucleótido de longitud completa de la invención.

Un anticuerpo de la invención puede producirse por lo tanto a partir de o suministrarse en forma de un polinucleótido que lo codifique y sea capaz de expresarlo. Cuando el anticuerpo comprende dos o más cadenas, un polinucleótido de la invención puede codificar una o más cadenas del anticuerpo. Por ejemplo, un polinucleótido de la presente divulgación puede codificar una cadena ligera de anticuerpo, una cadena pesada de anticuerpo, o ambas. Se pueden proporcionar dos polinucleótidos, uno de los cuales codifica una cadena ligera de anticuerpo y el otro codifica la correspondiente cadena pesada de anticuerpo. Dicho polinucleótido o par de polinucleótidos se pueden expresar juntos de manera que se genere un anticuerpo de la invención.

Los polinucleótidos de la invención se pueden sintetizar de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, como se describe a modo de ejemplo en Sambrook et al (1989, Molecular Cloning - a laboratory manual; Cold Spring Harbor Press).

Las moléculas de ácido nucleico de la presente pueden proporcionarse en forma de un casete de expresión que incluya secuencias de control unidas operativamente a la secuencia insertada, permitiendo de esta manera la expresión del anticuerpo de la presente divulgación *in vivo*. Esos casetes de expresión, a su vez, se proporcionan normalmente dentro de vectores (por ejemplo, plásmidos o vectores víricos recombinantes). Dicho casete de expresión se puede administrar directamente a un sujeto huésped. De manera alternativa, un vector que comprende un polinucleótido de la presente divulgación se puede administrar a un sujeto huésped. Preferentemente, el polinucleótido se prepara y/o administra utilizando un vector genético. Un vector adecuado puede ser cualquier vector que sea capaz de llevar una cantidad de información genética suficiente, y permitir la expresión de un polipéptido de la invención.

La presente divulgación incluye, por lo tanto, vectores de expresión que comprenden dichas secuencias de polinucleótido. Dichos vectores de expresión se construyen de manera rutinaria en la técnica de la biología molecular y puede implicar, por ejemplo, los usos de ADN plasmídico e iniciadores apropiados, promotores, amplificadores y otros elementos, tales como, por ejemplo, señales de poliadenilación que pueden ser necesarias, y que se posicionan en la orientación correcta, con el fin de permitir la expresión de un péptido de la invención. Otros vectores adecuados serán evidentes para los expertos en la técnica. A modo de ejemplo adicional a este respecto, los inventores remitan a Sambrook et al.

La presente divulgación también incluye las células que se han modificado para que expresen un anticuerpo de la invención. Dichas células incluyen, líneas celulares eucariotas superiores transitorias, o preferentemente estables, tales como células de mamífero o células de insecto, células eucariotas inferiores, tales como levaduras o células procariontas tales como células bacterianas. Ejemplos particulares de células que se pueden modificar mediante la inserción de vectores o casetes de expresión que codifican un anticuerpo de la invención incluyen las células de mamífero HEK 293T, CHO, HeLa, NS0 y COS. Preferentemente la línea celular seleccionada será una que sea no solamente estable, sino que también permita la glicosilación madura y la expresión en la superficie celular de un polipéptido.

Dichas líneas celulares de la invención se pueden cultivar utilizando métodos de rutina para producir un anticuerpo de la invención, o se pueden utilizar de manera terapéutica o profiláctica para suministrar los anticuerpos de la invención a un sujeto. De manera alternativa, los polinucleótidos, casetes de expresión o vectores se pueden administrar a una célula del sujeto *ex vivo* y devolver entonces la célula al cuerpo del sujeto.

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones y formulaciones que comprenden moléculas de la invención, tales como los anticuerpos, polinucleótidos, vectores y células descritas en el presente documento. Por ejemplo, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una o más moléculas de la invención, tal como uno o más anticuerpos de la invención, formulados junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como se utiliza en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y los similares que sean fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para su administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intramuscular, o subcutánea (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el anticuerpo puede recubrirse de un material que proteja el anticuerpo de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar o desnaturalizar el anticuerpo.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables preferidos comprenden los vehículos acuosos o diluyentes. Ejemplos de vehículos acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, agua tamponada y solución salina. Ejemplos de otros vehículos incluyen etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como el oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, mediante el

mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de las dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como el manitol, sorbitol, o cloruro sódico en la composición.

5 Una composición farmacéutica de la invención también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. Se puede asegurar la prevención de la presencia de microorganismos tanto mediante procedimientos de esterilización, *supra*, como mediante la inclusión de distintos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido sórbico fenol, y similares. Puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico, y similares en las composiciones. Además, se puede llevar a cabo la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retrasen la absorción tales como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

10 Las composiciones terapéuticas normalmente deben estar estériles y ser estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración del fármaco.

15 Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el principio activo (por ejemplo, un anticuerpo) en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se necesite, seguido por esterilización por microfiltración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el principio activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y el secado por congelación (liofilización) que dan lugar a un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución esterilizada por depresión previamente.

20 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender principios activos adicionales, así como un anticuerpo de la invención. Como se ha mencionado anteriormente, las composiciones de la invención pueden comprender uno o más anticuerpos de la invención. También pueden comprender agentes terapéuticos o profilácticos adicionales.

25 También dentro del alcance de la presente divulgación hay kits que comprenden los anticuerpos u otras composiciones de la invención y las instrucciones de uso. El kit puede contener adicionalmente uno o más reactivos adicionales, tales como un agente terapéutico o profiláctico adicional como se ha expuesto anteriormente.

30 Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar en terapia. En las aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos o composiciones se administran a un sujeto que ya padece un trastorno o afección, en una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente la afección o uno o más de sus síntomas. Dicho tratamiento terapéutico puede dar como resultado una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, o un aumento de la frecuencia o duración de los periodos libres de síntomas. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como "cantidad terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para un fin determinado dependerán de la gravedad de la enfermedad o lesión, así como del peso y el estado general del sujeto. Como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" incluye cualquier ser humano.

35 En particular, los anticuerpos contra el CD40 pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer. En consecuencia, la invención proporciona un anticuerpo de la invención, o un fragmento del mismo para su uso en el tratamiento del cáncer. La presente divulgación también proporciona un método de tratamiento del cáncer que comprende la administración a un individuo de un anticuerpo de la invención, o un fragmento del mismo. La invención también proporciona un anticuerpo de la invención, o un fragmento del mismo para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

40 El cáncer puede ser un cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer de pulmón, cáncer de cuello uterino, rhabdomyosarcoma, neuroblastoma, mieloma múltiple, leucemia, leucemia linfoblástica aguda, melanoma, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, linfoma, glioblastoma, linfoma o cáncer de piel.

45 En realizaciones particulares, el anticuerpo de la invención puede unirse (directa o indirectamente) a otro resto. El otro resto puede ser un agente terapéutico tal como un resto citotóxico o un fármaco. El otro resto puede ser un marcador detectable. El otro resto puede ser un resto de unión, tal como un anticuerpo específico tumoral o un dominio de unión polipeptídico específico de una diana terapéutico, preferentemente una diana terapéutica asociada con el cáncer, cuya diana no es el CD40 humano. La molécula biespecífica resultante puede utilizarse en el tratamiento del cáncer. Una diana terapéutica preferida que no es el CD40 humano es el CTLA-4 humano. Otras dianas incluyen PD1, PD-L1, CD27, HVEM, LAG3 y otros miembros de la familia del TNFR. Por lo tanto, a modo de ejemplo, el anticuerpo de la invención o un fragmento de unión al antígeno del mismo se puede unir (directa o indirectamente) a un dominio de unión polipeptídico específico del CTLA-4 humano. Dicho dominio de unión puede comprender o consistir en (i) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105 (la secuencia del dominio extracelular

monocelular del CD86 humano de tipo silvestre); o (ii) una secuencia de aminoácidos en la que al menos se ha cambiado un aminoácido cuando se compara con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105 a condición de que dicho dominio de unión se una al CTLA-4 humano con una afinidad mayor de lo que lo hace el CD86 humano de tipo silvestre. Los dominios de unión polipeptídicos preferidos específicos para el CTLA-4 humano incluyen los polipéptidos que comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 106, 107 y 108, cada una de las cuales es una variante del dominio extracelular del CD86 humano de tipo silvestre.

El agente terapéutico o un marcador detectable puede unirse directamente, por ejemplo, mediante conjugación química a un anticuerpo de la invención. Los métodos para la conjugación de agentes o marcadores a un anticuerpo se conocen en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar la conjugación por carbodiimida (Bauminger y Wilchek (1980) *Methods Enzymol.* 70, 151-159) para conjugar varios agentes, incluyendo la doxorubicina, a anticuerpos o péptidos. La carbodiimida hidrosoluble, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) es particularmente útil para la conjugación de un resto funcional con un resto de unión.

Otros métodos de conjugación de un resto con anticuerpos también se pueden utilizar. Por ejemplo, se puede utilizar la oxidación de peryodato sódico seguido por alquilación reductora de reactivos apropiados, como el entrecruzamiento con glutaraldehído. Sin embargo, se reconoce que, independientemente del método de producción de un conjugado de la invención que se seleccione, se debe hacer una determinación de que el anticuerpo mantiene su capacidad de direccionamiento y que el resto funcional mantiene su función relevante.

Un resto citotóxico puede ser directa y/o indirectamente citotóxico. Por "directamente citotóxico" se quiere decir que el resto es citotóxico por sí mismo. Por "indirectamente citotóxico" se quiere decir que, aunque el resto no es citotóxico por sí mismo, puede inducir citotoxicidad, por ejemplo, mediante su acción sobre una molécula adicional o mediante una acción adicional sobre ella. El resto citotóxico puede ser citotóxico solamente cuando es intracelular y preferentemente no es citotóxico cuando es extracelular.

Preferentemente, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, o una variante, fusión o derivado del mismo, en el que el resto citotóxico es un agente quimioterapéutico directamente citotóxico. Opcionalmente, el resto citotóxico es un polipéptido directamente citotóxico. Los agentes terapéuticos citotóxicos se conocen bien en la técnica.

Los agentes quimioterapéuticos citotóxicos, tales como los agentes anticáncer, incluyen: agentes alquilantes que incluyen mostazas nitrogenadas tales como mecloretamina (HN2), ciclofosfamida, ifosfamida, melfalan (L-sarcosina) y clorambucilo; etileniminas y metilmelaminas tales como hexametilmelanina, tiotepa; alquil sulfonatos tales como el busulfan; nitrosoureas tales como carmustina (BCNU), lomustina (CCNU) semustina (metil-CCNU) y estreptozocina (estreptozotocina); y triacenos tales como la dacarbazina (DTIC; dimetiltriazenoimidazol-carboxamida); Antimetabolitos que incluyen análogos del ácido fólico tales como el metotrexato (ametofterina); análogos de la pirimidina tales como el fluorouracilo (5-fluorouracilo; 5-FU), floxuridina (fluorodesoxiuridina; FUdR) y citarabina (arabinósido de citosina); y análogos de la purina e inhibidores relacionados tales como mercaptopurina (6-mercaptopurina; 6-MP), tioguanina (6-tioguanina; TG) y pentostatina (2'-desoxicoformicina). Los productos naturales incluyen los alcaloides de la vinca tales como la vinblastina (VLB) y vincristina; epipodofilotoxinas tales como etopósido y tenipósido; antibióticos tales como dactinomicina (actinomicina D), daunorrubicina (daunomicina; rubidomicina), doxorubicina, bleomicina, plicamicina (mitramicina) y mitomicina (mitomicina C); enzimas tales como L-asparaginasa; y modificadores de la respuesta biológica tales como interferón alfa. Los agentes misceláneos incluyen complejos de coordinación de platino, tales como cisplatino (cis-DDP) y carboplatino; antracenediona tal como la mitoxantrona y la antraciclina; urea sustituida tal como la hidroxurea; un derivado de la metil hidracina tal como la procarbazona (N-metilhidracina, MIH); y supresores adrenocorticales tales como el mitotano (o,p'-DDD) y aminoglucetimidato; taxol y análogos/derivados; y agonistas/antagonistas hormonales tales como la flutamida y el tamoxifeno.

En una realización de la invención es resto citotóxico es un resto citotóxico polipeptídico o peptídico que da lugar a la muerte celular. Los restos citotóxicos peptídicos y polipeptídicos se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, ricina, abrina, exotoxinas de *Pseudomonas*, factor tisular y similares. Los métodos para unirlos a los restos de direccionamiento tales como los anticuerpos se conocen bien en la técnica. Se describen otras proteínas inactivas dadas de ribosomas como agentes citotóxicos en el documento WO 96/06641. La exotoxina de *Pseudomonas* puede utilizarse también como polipéptido citotóxico. Ciertas citocinas, tales como el TNF α y la IL-2, también pueden ser útiles como agentes citotóxicos.

Ciertos átomos radioactivos también pueden ser citotóxicos si se suministran en dosis suficientes. Por lo tanto, el resto citotóxico puede comprender un átomo radioactivo que, cuando se utiliza, suministra una cantidad suficiente de radioactividad en el sitio diana como para que sea citotóxico. Los átomos radioactivos adecuados incluyen el fósforo-32, yodo-125, yodo-131, indio-111, renio-186, renio-188 o itrio-90, o cualquier otro isótopo que emita suficiente energía para destruir las células vecinas, orgánulos o ácido nucleico. Preferentemente, Los isótopos y densidad de átomos radioactivos en los agentes de la invención son de manera que se suministre una dosis de más de 4000 cGy (preferentemente al menos 6000, 8000 o 10000 cGy) en el sitio diana y, preferentemente, a las células en el sitio diana y sus orgánulos, particularmente el núcleo.

El átomo radioactivo puede unirse al anticuerpo, fragmento de unión al antígeno, variante, fusión o derivado del mismo de maneras conocidas. Por ejemplo, se puede unir EDTA u otro agente quelante al resto de unión y se utiliza ¹¹¹In o ⁹⁰Y. Los restos de tirosina se pueden marcar directamente con ¹²⁵I o ¹³¹I.

5 El resto citotóxico puede ser un polipéptido citotóxico indirectamente adecuado. En una realización particularmente preferida, el polipéptido citotóxico indirectamente es un polipéptido que tiene actividad enzimática y puede convertir un profármaco no tóxico y/o relativamente no tóxico en un fármaco citotóxico. Con los anticuerpos, se hace referencia a menudo a este tipo de sistema como ADEPT (Terapia enzimática de profármaco dirigida por anticuerpo). El sistema necesita que el anticuerpo localice la parte enzimática en el sitio deseado del cuerpo del paciente y después de permitir el tiempo para que la enzima se localice en el sitio, se administra un profármaco que es un sustrato de la enzima, el producto final de la catálisis es un compuesto citotóxico. El objetivo de la estrategia es maximizar la concentración de fármaco en el sitio deseado y minimizar la concentración de fármaco en los tejidos normales. En una realización preferida, el resto citotóxico es capaz de convertir un profármaco no citotóxico en un fármaco citotóxico.

La enzima y profármaco del sistema que utiliza una enzima dirigida como se describe en el presente documento puede ser cualquiera de las propuestas anteriormente. La sustancia citotóxica puede ser cualquier fármaco anticáncer que exista tal como un agente alquilante, un agente que se intercala en el ADN; un agente que inhibe cualquier enzima clave tales como la dihidrofolato reductasa, timidina sintetasa, ribonucleótido reductasa, nucleósido cinasas o topoisomerasa; o un agente que efectúe la muerte celular interactuando con cualquier otro constituyente celular. El etopósido es un ejemplo de un inhibidor de la topoisomerasa.

Los sistemas de profármacos publicados incluyen los que se enumeran en la Tabla 2, posterior.

25

TABLA 2

Enzima	Profármaco
Carboxipeptidasa G2	Derivados del ácido L-glutámico y mostazas del ácido benzoico, mostazas anilínicas, mostazas fenólicas mostazas de fenilendiamina; derivados fluorados de estos
Fosfatasa alcalina	Fosfato de etopósido Fosfato de mitomicina
Beta-glucuronidasa	Mostaza de p-Hidroxianilina -glucurónido Epirubicina-glucurónido
Penicilina-V-amidasa	Adriamicina-N fenoxiacetilo
Penicilina-G-amidasa	N-(4'-hidroxifenil acetil) palitoxina Doxorrubicina y melfalan
Beta-lactamasa	Mostaza nitrogenada-cefalosporina p-fenilendiamina; derivados de la doxorrubicina; derivado de la vinblastina-cefalosporina, mostaza cefalosporínica; un derivado del taxol
Beta-glucosidasa	Ácido cianofenilmetil-beta-D-gluco-piranosidurónico
Nitrorreductasa	5-(Azaridina-1-il)-2,4-dinitrobenzamida
Citosina desaminasa	5-Fluorocitosina
Carboxipeptidasa A	Metotrexato-alanina

Las enzimas adecuadas para formar parte de una parte enzimática incluyen: exopeptidasas, tales como carboxipeptidasas G, G1 y G2 (para los profármacos de mostaza glutamylada), carboxipeptidasas A y B (para profármacos basados en MTX) y aminopeptidasas (para profármacos 2- α -aminocil MTC); endopeptidasas, tales como, por ejemplo, trombolisina (para profármacos de trombina); hidrolasas, tales como fosfatasa (por ejemplo, fosfatasa alcalina) o sulfatasas (por ejemplo, aril sulfatasas) (para profármacos fosforilados o sulfatados); amidasas, tales como penicilina amidasas y arilcil amidasa; lactamasas, tales como β -lactamasas; glicosidasas, tales como β -glucuronidasa (para antraciclinas β -glucuronómido), α -galactosidasa (para la amigdalina) y β -galactosidasa (para la β -galactosa antraciclina); desaminasas, tales como citosina desaminasa (para 5FC); cinasas, tal como urocinasa y timidina cinasa (para ganciclovir); reductasas, tal como nitrorreductasa (para CB1954 y análogos), azorreductasa (para mostazas azobencénicas) y DT-diaforasa (para CB1954); oxidasas, tal como glucosa oxidasa (para la glucosa), xantina oxidasa (para xantina) y lactoperoxidasa; DL-racemasas, anticuerpos catalíticos y ciclodextrinas.

40 Preferentemente, el profármaco es relativamente no tóxico en comparación con el fármaco citotóxico. Normalmente, tiene menos de un 10 % de toxicidad, preferentemente menos de un 1 % de toxicidad según se mide en un ensayo de citotoxicidad *in vitro* adecuado.

45 Es probable que el resto que es capaz de convertir un profármaco en un fármaco citotóxico será activo en el aislamiento del resto del agente de la invención, pero solamente es necesario que esté activo cuando (a) está en combinación con el resto del agente de la invención y (b) el agente de la invención está unido a, adyacente a o internalizado en las células diana.

5 Cuando cada resto es un polipéptido, las dos partes se pueden unir juntas por cualquiera de las maneras convencionales de entrecruzamiento de polipéptidos. Por ejemplo, el anticuerpo, fragmento de unión al antígeno, variante, fusión o derivado del mismo, puede enriquecerse con grupos tiol y el resto adicional se hace reaccionar con un agente bifuncional capaz de reaccionar con los grupos tiol, por ejemplo, el éster N-hidroxisuccinimida del ácido yodoacético (NHIA) o N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP). Los enlaces amida y tioéter, por ejemplo, que se consiguen con un éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxi-succinimida, son en general más estables *in vivo* que los enlaces disulfuro.

10 De manera alternativa, el anticuerpo, fragmento de unión al antígeno, variante, fusión o derivado del mismo, se puede producir como un compuesto de fusión mediante técnicas de ADN recombinante de forma que la longitud del ADN comprende regiones respectivas que codifican los dos restos del agente de la invención sea adyacentes entre ellos o separados por una región que codifique un enlazador peptídico que no destruye las propiedades deseadas del agente. Se puede concebir que las dos partes de agente pueden solaparse completa o parcialmente.

15 El resto citotóxico puede ser un radiosensibilizador. Los radiosensibilizadores incluyen las fluoropirimidinas, análogos de timidina, hidroxiurea, gemcitabina, fluradabina, nicotinamida, pirimidinas halogenadas, 3-aminobenzamida, 3-aminobenzodiamina, etanixadol, pimonidazol y misonidazol. También, el suministro de los genes en las células puede radiosensibilizarlas, por ejemplo, el suministro del gen p53 o ciclina D. El resto adicional puede ser que se vuelva citotóxico, o libere un resto citotóxico, con la radiación. Por ejemplo, el isótopo Boro-10, cuando se radia apropiadamente, libera partículas α que son citotóxicas. De manera similar, el resto citotóxico puede ser uno que sea útil en terapia fotodinámica tal como fotofrina.

20 El resto adicional puede comprender una molécula de ácido nucleico que es directa o indirectamente citotóxica. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico puede ser un oligonucleótido antisentido que, al localizarse en el sitio diana, es capaz de meterse en las células y dar lugar a su muerte. El oligonucleótido, por lo tanto, puede ser que evite la expresión de un gen esencial, o que dé lugar a un cambio de la expresión genética que produzca apoptosis. De manera alternativa, el resto citotóxico es una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido directo y/o indirectamente citotóxico. Ejemplos de oligonucleótidos adecuados incluyen los que se dirigen al bcl-2, la ADN polimerasa α y la topoisomerasa II α . Los ácidos nucleicos peptídicos pueden ser útiles en lugar de los ácidos nucleicos convencionales.

25 El anticuerpo, fragmento de unión al antígeno, variante, fusión o derivado del mismo pueden estar comprendidos en un vehículo de suministro para el suministro de ácido nucleico en la diana. El vehículo de suministro puede ser cualquier vehículo de suministro adecuado. Puede ser, por ejemplo, un liposoma que contenga el ácido nucleico o puede ser un virus o una partícula tipo virus que sea capaz de suministrar el ácido nucleico. En estos casos, la molécula que se va a suministrar está presente normalmente sobre la superficie del vehículo de suministro. Por ejemplo, puede estar presente un anticuerpo o fragmento en la superficie externa de un liposoma y el ácido nucleico suministro puede estar presente en el interior del liposoma. Como otro ejemplo, se modifica un vector vírico, tal como un vector retrovírico o adenovírico, de manera que el resto de unión se une o localiza en la superficie de la partícula vírica haciendo posible de esta manera que la partícula vírica se dirija al sitio deseado. Se pueden utilizar inmunoliposomas (liposomas dirigidos por anticuerpos). En un método para la preparación de inmunoliposomas, se sintetiza MPB-PE (N-[4-(p-maleimidofenil)-butiril]-fosfatidiletanolamina) de acuerdo con el método de Martin y Papahadjopoulos (1982) J. Biol. Chem. 257, 286-288. El MPB-PE se incorpora en las bicapas liposómicas para permitir un acoplamiento covalente del anticuerpo, o fragmento del mismo, a la superficie liposómica. El liposoma se carga convenientemente con el ADN u otra construcción genética para el suministro en las células diana, por ejemplo, formando dichos liposomas en una solución del ADN u otra construcción genética, seguido por la extrusión secuencial a través de filtros de membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 0,6 μm y 0,2 μm bajo presiones de nitrógeno de hasta 0,8 MPa. Después de la extrusión, la construcción de ADN atrapada se separa de la construcción de ADN libre mediante ultracentrifugación a 80 000 x g durante 45 min. Los liposomas de MPB-PE recién preparados en tampón desoxigenado se mezclan con el anticuerpo recién preparado (o un fragmento del mismo) y se llevan a cabo las reacciones de acoplamiento en una atmósfera de nitrógeno a 4 °C rotación constante extremo sobre extremo durante una noche. Los inmunoliposomas se separan de los anticuerpos no conjugados mediante ultracentrifugación a 80 000 x g durante 45 min. Los inmunoliposomas se pueden inyectar por vía intraperitoneal o directamente en el tumor.

30 El ácido nucleico suministrado en el sitio diana puede ser cualquier ADN adecuado que dé lugar, directa o indirectamente, a citotoxicidad. Por ejemplo, el ácido nucleico puede codificar una ribozima que sea citotóxica para la célula, o puede codificar una enzima que sea capaz de convertir un profármaco sustancialmente no tóxico en un fármaco citotóxico (este último sistema se llama a veces GDEPT: Terapia enzimática de profármaco dirigida genéticamente). Las ribozimas adecuadas incluyen las polimerasas, desfosforilasas, y endonucleasas de restricción. Las dianas adecuadas para las ribozimas incluyen los factores de transcripción tales como c-fos y c-myc, y bcl-2. Se aplican consideraciones similares en lo concerniente a la elección de la enzima y el profármaco en el sistema GDEPT que en el sistema ADEPT descrito anteriormente. El ácido nucleico suministrado en el sitio diana puede codificar un polipéptido directamente citotóxico.

El agente terapéutico unido al anticuerpo puede comprender un polipéptido o un polinucleótido que codifique un polipéptido que no sea directa o indirectamente citotóxico pero que tenga un beneficio terapéutico. Ejemplos de dichos polipéptidos incluyen citocinas anti-proliferativas o antiinflamatorias, e inmunomoduladores o factores anti-proliferativos, que tengan influencia sobre la coagulación sanguínea que puedan tener un beneficio en medicina, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer. El agente puede ser útil como inhibidor de la angiogénesis tales como los péptidos angiostatina o endostatina. El agente también puede ser útil como enzima que convierta un polipéptido precursor en angiostatina o endostatina. Metaloproteasas de la matriz humanas tales como la elastasa de macrófagos, la gelatinasa y estromolisina que convierten el plasminógeno en angiostatina. El plasminógeno es un precursor de la angiostatina.

El anticuerpo se puede unir a un marcador detectable. Por "marcador detectable" se quiere decir que el anticuerpo se une a un resto que, cuando se localiza en el sitio diana después de la administración del anticuerpo a un paciente, se puede detectar, normalmente de manera no invasiva desde fuera del cuerpo y se localiza el sitio de la diana. Por lo tanto, el anticuerpo puede ser útil en la creación de imágenes y el diagnóstico.

Normalmente, el marcador es o comprende un átomo radioactivo que es útil en la creación de imágenes. Los átomos radioactivos adecuados incluyen el ^{99m}Tc , y ^{123}I para los estudios de centelleográficos. Otros marcadores incluyen, por ejemplo, marcadores de centrifuga para la creación de imágenes por resonancia magnética (MRI) tales como el ^{123}I de nuevo, ^{131}I , ^{111}In , ^{19}F , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , gadolinio, manganeso o hierro. Claramente, se tienen que unir suficientes isótopos atómicos apropiados al anticuerpo con el fin de que la molécula se pueda detectar fácilmente.

El radiomarcador u otros se pueden incorporar de maneras conocidas. Por ejemplo, el anticuerpo, o un fragmento del mismo se puede biosintetizar o se puede sintetizar mediante síntesis química de aminoácidos utilizando precursores adecuados de aminoácidos que implican, por ejemplo, el fluoro-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores tales como ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{186}Rh , ^{188}Rh y ^{111}In pueden unirse, por ejemplo, mediante restos de cisteína en polipéptidos. El irio-90 se puede unir mediante un resto de lisina. Preferentemente, el marcador detectable comprende un átomo radioactivo, tal como, por ejemplo, el tecnecio- 99m o el yodo-123. De manera alternativa, el marcador detectable se puede seleccionar de entre el grupo que comprende: yodo-123; yodo-131, indio-111; flúor-19; carbono-13; nitrógeno-15; oxígeno-17; gadolinio; manganeso; hierro.

En una realización, un anticuerpo de la invención es capaz de unirse selectivamente a un resto directa o indirectamente citotóxico o a un marcador detectable. Por lo tanto, en esta realización, el anticuerpo se une a un resto que se une a un compuesto o componente adicional que sea citotóxico o fácilmente detectable.

Un anticuerpo o fragmento de la presente invención, o una composición que comprenda dicho anticuerpo o fragmento, puede administrarse mediante una o más vías de administración utilizando uno o más de varios métodos conocidos en la técnica. Como será evidente para el experto en la técnica, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración preferidas para los anticuerpos o composiciones de la invención incluyen la intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenterales, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La frase "administración parenteral" como se utiliza en el presente documento significa los modos de administración distintos de la administración entérica y tópica, habitualmente mediante inyección. De manera alternativa, un anticuerpo o composición de la invención se puede administrar mediante una vía no parenteral, tal como por una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa.

Se prefiere la administración local, incluyendo la peritumoral, yuxtatumoral, intratumoral, intralesional, perilesional, infusión intra cavitaria, administración intravesical, y por inhalación. Sin embargo, el anticuerpo o composición también puede administrarse sistémicamente.

Una dosificación adecuada de un anticuerpo de la invención puede determinarla un facultativo médico experto. Los niveles de dosificación actuales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse de manera que se obtenga una cantidad del principio activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente en particular, composición y modo de administración, sin que sea tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de varios factores farmacocinéticos incluyendo la actividad del anticuerpo particular que se emplee, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del anticuerpo, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, estado, salud general e historia médica anterior del paciente que se va a tratar, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Una dosis adecuada de un anticuerpo de la invención puede estar, por ejemplo, en el intervalo de desde aproximadamente $0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$ a aproximadamente $100 \text{ mg}/\text{kg}$ de peso corporal del paciente que se va a tratar. Por ejemplo, una dosificación adecuada puede ser desde aproximadamente $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ a aproximadamente $10 \text{ mg}/\text{kg}$ de peso corporal por día o desde aproximadamente $10 \text{ g}/\text{kg}$ a aproximadamente $5 \text{ mg}/\text{kg}$ por peso corporal por día.

Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una

- respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar una única embolada, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente como indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de dosificación. Forma de dosificación unitaria como se utiliza en el presente documento se refiere a unidades separadas físicamente adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se van a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de principio activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico necesario.
- Los anticuerpos se pueden administrar en una única dosis o en múltiples dosis. Las dosis múltiples se pueden administrar mediante la misma o diferentes vías y en la misma o en diferentes localizaciones. De manera alternativa, los anticuerpos pueden administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se necesita una administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia puede variar dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente y la duración del tratamiento que se desee. La dosificación y frecuencia de administración también puede variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En las aplicaciones profilácticas, se puede administrar una dosificación relativamente baja en intervalos relativamente poco recuentes durante un largo periodo de tiempo. En las aplicaciones terapéuticas, se puede administrar una dosificación relativamente alta, por ejemplo, hasta que el paciente muestre una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad.
- La administración combinada de dos o más agentes se puede conseguir de varias maneras diferentes. En una realización, el anticuerpo y el otro agente pueden administrarse juntos en una única composición. En otra realización, el anticuerpo y el otro agente pueden administrarse en composiciones separadas como parte de una terapia de combinación. Por ejemplo, el anticuerpo puede administrarse antes, después o a la vez que el otro agente. El anticuerpo de la invención se puede administrar en combinación con o secuencialmente a los anticuerpos de direccionamiento tumoral, terapia dirigida, inhibidores de ruta u otros anticuerpos inmunomoduladores que se dirigen, por ejemplo, a PD-1, PD-L1, CD137, GITR, OX40, CTLA-4, CD27, HVEM, LtBR, y LAG3. Además del anticuerpo de la invención, también se puede combinar con radiación local.
- La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no se deberían considerar como limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Selección de clones de anticuerpo en una biblioteca de anticuerpos scFv humanos

- Se llevaron a cabo selecciones de clones de anticuerpo scFv de unión al CD40 utilizando una biblioteca de scFv humanos completos que contenían más de 1×10^{10} miembros únicos. El procedimiento general para la selección de los clones de anticuerpo de unión al CD40 era el siguiente:
- Las reservas de fago se preseleccionaron inicialmente contra perlas magnéticas revestidas de estreptavidina (Dynabeads M-280, Invitrogen, n.º 112.06D) o contra beriglobina-biotina ((ZBL Behring) estreptavidina pre-acoplada con el fin de retirar las uniones no específicas. Estaba presente un exceso de mlgG (Jackson 015-000-003) en todas las rondas de selección con el fin de retirar las presuntas uniones a Fc. Se llevaron a cabo selecciones de CD40 biotinilado fusionado a Fc (Ansell 504-030) para 5 rondas de selección (intervalo de concentración de 100 nM a 0,1 nM). Se incluyó suero fetal bovino (BSA, n.º) como agente bloqueante a lo largo del periodo de selección con una concentración final del 1 %.
- La biblioteca de fagos scFv preseleccionada se incubó con el CD40 biotinilado durante al menos 1 h y a continuación, los fagos que expresaban la unión de scFv al CD40 se capturaron sobre perlas de estreptavidina o la librería de fagos scFv preseleccionados se añadieron a tubos de Eppendorf bloqueados que contenían el antígeno CD40 durante 1 h. Se lavaron los diferentes complejos repetidamente con aumento de rigurosidad. Se utilizó una digestión con tripsina (Lonza, n.º 17-161E) para eluir la unión del fago a las perlas de estreptavidina y se añadió Aprotinina (Roche, n.º 1023662401). El fago eluido se utilizó para la infección de células XL1-Blue en fase logarítmica (que se originaron del n.º 200228, Stratagene) durante 30 min a 37 °C que se diseminaron sobre QTrays (Agar 23YT/Ampicilina/Tetraciclina/Glucosa 50 µg/ml, 10 µg/ml, 1 %) y se incubaron durante una noche a 37 °C.
- Al día siguiente se rasparon las QTray, se diluyeron las bacterias y se permitió que crecieran hasta la fase logarítmica. La reserva de fagos se hizo infectando las XL1-Blue en fase logarítmica con un exceso de 20x de fagos auxiliares M13K07 (New England Biolabs, N0315S), se indujo la expresión de scFv presentado en la superficie del fago mediante la adición de IPTG y los cultivos inducidos se cultivaron durante una noche a 30 °C. La reserva de fagos amplificada se precipitó con PEG/NaCl (20 % p/v) antes de la próxima ronda de selección. El número de fagos eluido, así como el número de fagos de entrada en las rondas de selección se monitorizó mediante titulación (es decir, infección de células XL1-Blue en fase logarítmica y recuento de las unidades formadoras de colonias).

Ejemplo 2 - Exploración y determinación de secuencia de los clones de anticuerpo scFv

Se llevaron a cabo la exploración de clones de anticuerpo unidos a la diana CD40 y la secuenciación posterior. Se identificaron las uniones detectando la unión a CD40 en un ensayo de ELISA de fagos. Los clones de anticuerpo identificados se secuenciaron y se determinaron sus CDR (regiones determinantes de complementariedad) - véase el Ejemplo 5.

5 Los clones únicos de las últimas rondas de selección se escogieron y cultivaron en placas de 96 pocillos y se cultivaron durante una noche. Al día siguiente, se inocularon placas nuevas con los cultivos de una noche y se cultivaron en un medio bajo en glucosa (2xYT/Ampicilina/Tetraciclina/Glucosa 50 µg/ml, 10 µg/ml, 0,05 %) y se añadió un exceso de 20x del fago auxiliar M13K07 (New England Biolabs, N0315S) cuando los cultivos alcanzaron la fase logarítmica. La expresión del scFv presentado en la superficie del fago se indujo mediante la adición de IPTG.

15 Al día siguiente, se recolectaron los sobrenadantes y se utilizaron en el ELISA de fago. Se utilizó un vector vacío como control negativo y un fagémido que codificaba una unión con el CD40 se incluyó como control positivo. Se revistieron placas de unión alta (Greiner n.º 781074) con CD40 (R&D Systems n.º 629-LR) a 0,1 - 1 µg/ml, o con Orenca (Bristol Myer Scribb) (0,5 µg/ml). Los pocillos revestidos se bloquearon y se añadió el sobrenadante que contenía los fagos. La unión del fago se detectó con un anti-M13-HRP (GE, 27-9421-01) y se utilizó como sustrato el Super Signal Pico Chemiluminescent (Pierce, n.º 37069). Se incluyó la Orenca para excluir la posibilidad de seleccionar fagos que se unieran a las regiones Fc.

20 Los fagémidos que se unieron al CD40 se secuenciaron. La secuenciación del ADN se llevó a cabo de acuerdo con métodos convencionales en MWG (Alemania). Las regiones CDR se determinaron utilizando el sistema IMG. Las herramientas de alineamiento están disponibles en <http://www.imgt.org/>.

25 **Ejemplo 3 - Clonación al formato de anticuerpo completo y ensayo adicional en cuanto a la unión al CD40**

Los clones de anticuerpo de unión al CD40 se re-clonaron en formato de IgG completa empleando dos vectores de expresión para la VH y VL, respectivamente. Los plásmidos se prepararon y las construcciones se verificaron mediante secuenciación. Se transfectaron células 293 Freestyle (Invitrogen, n.º R790-07) con los plásmidos VH y VL y después de 6 días, se recolectaron los sobrenadantes y se purificó la IgG completa expresada sobre columnas FF de Proteína A (GE Healthcare). Los anticuerpos purificados se analizaron utilizando SDS-PAGE, A280, y HPLC.

35 Se calculó el punto isoeléctrico teórico, pI, se calculó para cada anticuerpo utilizando el software GP-MAW (versión 9.2, de Lighthouse Data), asumiendo que todas las cisteínas están oxidadas (están formados los puentes S-S). Los resultados se muestran en la Tabla 3. Los clones de anticuerpo de la invención tienen valores altos del punto isoeléctrico teórico, lo que es favorable para la inmunoterapia local en el tratamiento del cáncer.

TABLA 3 - Punto isoeléctrico determinado *in silico*

Clon de anticuerpo	pI teórico
1136/1137	9,22
1132/1133	9,29
1148/1149	9,22
1140/1135	9,22
1138/1135	9,21
1134/1135	9,22
1107/1108	9,30
1142/1135	9,22
1146/1147	9,28
1150/1151	9,12

40 Las moléculas de IgG completa purificadas se analizaron con un ELISA. Se revistieron placas LIA de fondo plano y alta unión (Greiner n.º 655074) con CD40 fusionado con Fc (Ansell, n.º 504-820) a 0,05 µg/ml, y se utilizó leche en polvo al 3 % para el bloqueo y al 1 % para la dilución. Los anticuerpos que se van a ensayar se añadieron en diluciones en serie comenzando a 50 µg/ml y se llevó a cabo la detección utilizando un anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con HRP-Fc (Jackson ImmunoResearch, n.º 109-035-098) y se utilizó Super Signal Pico Chemiluminescent (ThermoScientific, n.º 37069) como sustrato. Los resultados del ELISA se muestran en la Figura 1 y se calcula en CE50 en la Tabla 4.

TABLA 4 – ELISA de unión al CD40 (CE50) en ng/ml

Clon*	1138/1135	1136/1137	1146/1147	1148/1149	1132/1133	1134/1135	1142/1135	1140/1135	1107/1108	1150/1151
CE50	970	1400	580	2200	280	25	560	310	34	41

Todos los anticuerpos se unían al CD40 y no presentaban unión específica a Orenia (datos no mostrados). La afinidad para el CD40 de todos los anticuerpos se había confirmado con la resonancia de plasmones superficiales (véase el Ejemplo 6 posterior).

- 5 La unión de anticuerpos agonistas anti-CD40 al CD40 sobre las células B daba como resultado la activación y proliferación de células B, la agregación homeotípica y la regulación positiva de los marcadores de superficie tales como CD23, CD30, CD80, CD86, Fas, complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) II y citocinas solubles, por ejemplo, IL-6, TNF- α y TNF- β (Schönbeck y Libby, 2001, Cell Mol Life 58(1), 4-43). La medición de la proliferación de células B inducida por CD40 se utiliza comúnmente para evaluar los anticuerpos agonistas CD40 (Pound et al, 1999, Int Immunol, (11), 11-20). En consecuencia, se llevó a cabo un ensayo de proliferación de células B para las moléculas de IgG completa. Las células B se aislaron mediante filtros de leucocitos de 2-4 donantes y se incubaron con las moléculas de IgG completa purificadas e IL-4 durante tres días. La IgG1 humana se utilizó como control negativo. La proliferación de células B se midió con el Cell-titer glow (Promega, n.º G7571) que mide el contenido en ATP de las células. Los resultados del ensayo de proliferación de células B para todos los anticuerpos se muestra en la Figura 2 y la CE50 calculada en la Tabla 5. Los clones de anticuerpos de la invención son todos anticuerpos agonistas anti-CD40.
- 10
- 15

TABLA 5 – Potencia de proliferación de células B (CE50) en µg/ml

Clon*	1138/1135	1136/1137	1146/1147	1148/1149	1142/1135	1132/1133	1134/1135	1140/1135	1107/1108	1150/1151
CE50	4,5	1,0	3,6	2,3	1,5	2,2	1,0	0,4	0,7	0,9

Se llevó a cabo un experimento de mapeo del epítipo en un ensayo que ensayaba la capacidad de los anticuerpos para competir con el CD40L por la unión al CD40 sobre la superficie celular. Se lavaron las células Wehi transfectadas con el CD40 humano en tampón FACS (PBS, un 0,5 % de FBS y un 0,05 % de Azida sódica) y se preincubaron con anticuerpos CD40 (25 µg/ml) o un isotipo de control (IgG1 humana, 25 µg/ml) durante 30 min a +4 °C. El CD40L humano (0,5 µg/ml) se añadió a las células sin lavar y se incubaron durante 30 minutos a +4 °C. Las células se lavaron y se añadió un anticuerpo secundario anti-HA-PE, que detecta el CD40L durante otros 15 minutos. Las células se lavaron tres veces antes del análisis FACS. Los resultados se muestran en la Figura 3. Las barras negras llenas indican la no competición, la barra vacía indica fuerte competición, la barra rayada horizontalmente indica baja o ninguna competición, las barras punteadas en negro indican baja o ninguna competición con el CD40L para la diana CD40 por los clones de anticuerpo.

Los anticuerpos CD40 pueden dividirse normalmente en tres grupos o clases con diferentes perfiles contra el receptor del CD40, basándose en su capacidad para competir con el CD40L como se ilustra en la Figura 3.

La primera clase de los clones de anticuerpo, denominada CDRH3A, incluye el clon 1107/1108. Los anticuerpos de esta clase bloquean completamente la unión del CD40L al CD40. Se unen a un epítipo próximo al sitio de unión del CD40L, y/o se unen al CD40 de una manera que afecta al sitio de unión del CD40L en el CD40 induciendo cambios conformacionales.

La segunda clase de clones de anticuerpo, denominada CDRH3B, incluye 1140/1135, 1138/1135, 1134/1135, 1142/1135. Los anticuerpos de esta clase no bloquean la unión del CD40L al CD40, y por lo tanto se unen en un epítipo separado distinto del sitio de unión del CD40L y la clase CDRH3A. La clase CDRH3B comparte una CDRH3 de 12 aminoácidos de longitud y una secuencia de bucle de consenso de: A, R, G, P, F/V/A, Y, S, S/T, V/Y/F, F/I/L, D, Y. Además, la clase CDRH3B tiene las regiones CDRL3 y CDRH1 en común.

La tercera clase de clones de anticuerpo, denominada CDRH3C, incluye 1148/1149, 1132/1133, 1146/1147, y 1136/1137. Los anticuerpos de esta clase presentan una competición media con CD40L, y se unen a un epítipo que se solapa parcialmente con el del CD40L o afectan parcialmente la unión del CD40L al CD40 induciendo cambios conformacionales. Esta clase tiene una secuencia de consenso en CDRH3 que contiene un motivo FG. Los aminoácidos de consenso, en las posiciones 105-117, son A, R, A/Y/R, V, -/N, F, G, F/M/I, D, Y. El tamaño del bucle CDRH3 de consenso es de 9 aminoácidos.

Por lo tanto, cada una de las tres clases CDRH3A-C representa las propiedades ventajosas de la unión al CD40 que pueden complementarse entre ellas.

Ejemplo 4 - Efectos *in vivo* del anticuerpo anti-CD40 administrado por diferentes vías

El estudio investigó la extensión de la activación de células dendríticas a continuación de la administración intratumoral (local) frente a intraperitoneal (sistémica) de una única dosis baja del anticuerpo anti-CD40 a ratones con tumores establecidos. Se evaluó el efecto de activación en tumores de un tamaño de 220 mm³ +/- 100 (SD) mm².

Se utilizaron células de cáncer de vejiga MB49 para iniciar tumores en ratones C57BL/6 hembra de 8 semanas de edad (Taconic). El día 0, se inocularon 0,25 x 10⁶ células por vía subcutánea en el flanco derecho del ratón. El día 14, se inyectó a los ratones bien por vía intratumoral o por vía intraperitoneal el anticuerpo anti-CD40 FGK45 adquirido en BioXcell (un total de 1 µg, 30 µg de anticuerpo por ratón, o sin tratar; 4 ratones por grupo). El día 16, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical. Se recolectaron los ganglios linfáticos de drenaje tumoral en medio completo y se agruparon dos tumores o ganglios linfáticos de cada grupo experimental.

El tejido recolectado se homogeneizó enzimáticamente y mecánicamente utilizando Liberase TL (Roche) y filtros de malla de nailon (100 µm; Fischer Scientific). La membrana se lavó completamente con medio RPMI que contenía 3-10 mM de EDTA y un 0,1 % de suero fetal bovino para preparar las suspensiones de células únicas. Las células aisladas se lavaron en PBS que contenía un 0,5 % de albúmina sérica bovina, y se bloqueó la unión inespecífica a Fc tratando las células con IgG de ratón (Sigma Aldrich). Las células se tiñeron con anticuerpos anti-CD86-APC (BD Pharmingen) diluidos 1:100, o con los anticuerpos de control que coincidían con el isotipo apropiado (BD Pharmingen y Serotec). Las células de bazo murino teñidas se utilizaron para la compensación. Las células teñidas se analizaron mediante citometría de flujo utilizando un FACScalibur (Becton Dickinson) y el software de análisis CellQuest. El resultado era el porcentaje de células dendríticas activadas en los ganglios linfáticos de drenaje del tumor medido 2 días después de la inyección con anticuerpo, que se mide determinando el porcentaje de células positivas a CD86 presentes. Se restó el % de células CD86 obtenido de los ganglios linfáticos de drenaje tumoral de ratones no tratados (resta del ruido). Los resultados se muestran en la Figura 4.

Los resultados sugieren que el tratamiento intratumoral producía un aumento de la respuesta de más de 30 veces. Este era un resultado inesperado, en el que había una diferencia mayor entre la administración local y sistémica de la que se había publicado anteriormente. La mayor activación de las células dendríticas en los ganglios linfáticos de drenaje tumoral en los animales que tenían el tumor sugiere sorprendentemente un aumento de potencia y eficacia

en la administración local de los anticuerpos anti-CD40. Además, esto sugiere que una única dosis baja de 0,04 mg/kg de anticuerpo agonista anti-CD40 constituirá una dosis terapéutica si se administra localmente. La concentración tumoral máxima obtenida del anticuerpo CD40 en este experimento era de 5 µg/ml (1/0,220) (asumiendo que el anticuerpo no se escapa del tumor). Esto sugiere que la dosis terapéutica podría ser tan baja como de 5 µg en un ser humano para el tratamiento de 1 cm³ de tumor.

Ejemplo 5 - evaluación de la reactividad cruzada con el CD40 de mono

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-CD40 para unirse al CD40 de mono midiendo la unión a las células HEK que expresaban el CD40 de Cynomolgus sobre la superficie celular.

Las células HEK se transfectaron con 1 o 10 µg/ml de CD40 de Cynomolgus insertado en el vector pcDNA 3.1. Las células transfectadas se clasificaron por FACS. La unión del CD40 de Cynomolgus a los clones de anticuerpo CD40 se analizó y comparó con la unión no específica del vector HEK vacío. Cinco de los clones de anticuerpo CD40 reaccionaban de manera cruzada con el CD40 de mono. Los resultados se resumen en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 6

Clon de anticuerpo CD40	Reactividad cruzada con monos Cynomolgus
1107/1108	+
1132/1133	+
1140/1135	+
1150/1151	+
1134/1135	+

Ejemplo 6 - Determinación de las constantes de afinidad para los anticuerpos anti-CD40 mediante resonancia de plasmones superficiales

Las constantes de afinidad de los anticuerpos purificados se evaluaron mediante resonancia de plasmones superficiales utilizando el instrumento Biacore 3000 de acuerdo con los protocolos del fabricante. Se inmovilizó el CD40hfc (R&D systems, USA) en el chip sensor del Biacore, CM5, utilizando un acoplamiento de amina convencional. La asociación se siguió durante 3 minutos y la disociación durante 12 minutos. Se llevó a cabo la regeneración dos veces utilizando 50 mM de NaOH durante 30 segundos. Los parámetros cinéticos y las constantes de afinidad se calcularon utilizando el software BIAevaluation 4.1. Los clones de anticuerpo CD40 se ejecutaron en el sensor con un caudal de 30 µl/min en HBS-P (GE, BR-1003-68) con intervalos de concentración entre 1-100 o 1-300 nM y se analizaron utilizando Langmuir 1:1 con una línea basal flotante.

Se demostró que la constante de afinidad (KD) para la unión para cada uno de los anticuerpos de la invención al CD40 estaba en el intervalo de 1-10 nM. La velocidad de asociación (ka) para cada uno de los anticuerpos estaba en el intervalo de 0,4-3,4 x 10⁶ 1/M. La velocidad de disociación (kd) para cada uno de los anticuerpos estaba en el intervalo de 1-10 x 10⁻³ 1/s. Los resultados se muestran en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7

Anticuerpo CD40	ka (1/M)	kd (1/s)	KD (M)
1107/1108	1,0 x 10+06	1,3 x 10-03	1,3 x 10-09
1132/1133	3,4 x 10+06	8,1 x 10-03	2,4 x 10-09
1134/1135	4,0 x 10+05	1,4 x 10-03	3,4 x 10-09
1136/1137	8,7 x 10+05	9,5 x 10-03	1,1 x 10-08
1140/1135	1,1 x 10+06	4,3 x 10-03	3,9 x 10-09
1150/1151	2,2 x 10+06	3,4 x 10-03	1,5 x 10-09

Ejemplo 7 - Activación de las células dendríticas derivadas de monocito

Se obtuvieron células positivas a CD14 mediante selección positiva de células mononucleares de sangre periférica humana utilizando perlas magnéticas (Miltenyi Biotech Norden AB, Lund, Suecia, 130-050-201). Las células dendríticas derivadas de monocitos (moDC) se maduraron a partir de células positivas a CD14 mediante estimulación con 150 ng/ml de GM-CSF (Life Technologies, n.º de cat PHC2011) y 50 ng/ml de IL-4 (Life Technologies, n.º de cat PHC0045) durante 6 días. Las células dendríticas derivadas de monocitos se estimularon con los anticuerpos de ensayo o de control durante 48 h. Se recolectaron los sobrenadantes y se analizó la activación de las DC como el aumento de la producción de la IL-12p40 con un ELISA (BD Biosciences, n.º de cat 555171). Se calculó el índice de activación de las DC dividiendo los niveles de IL-12p40 obtenidos con los anticuerpos de ensayo a 10 µg/ml o 33 µg/ml con los niveles de IL-12p40 obtenidos con un isotipo de control a las concentraciones correspondientes.

Se evaluó la activación de DC para tres anticuerpos de ensayo. Los anticuerpos 1150/1151, 1107/1108 y 1132/1133

demonstraron tener buenas propiedades de activación de DC. Los resultados también se muestran resumidos en la Tabla 9.

Ejemplo 8 - Mapeo del dominio quimérico

5 La parte extracelular del CD40 consiste en cuatro dominios, en el que cada dominio se puede subdividir en dos módulos. Intercambiando dominios o módulos en el receptor del CD40 con la secuencia del CD40 murino correspondiente, se pueden expresar receptores quiméricos funcionales. Ninguno de los anticuerpos ensayados en este ensayo se unía al CD40 murino. Por lo tanto, identificando a qué construcciones quiméricas no era capaz de unirse un anticuerpo de ensayo, se podía identificar el dominio de unión, o módulo de unión de cada anticuerpo en el CD40 humano. Si dos anticuerpos compartían el mismo patrón de unión a las diferentes quimeras, significaba que dependen de los mismos módulos o dominios del CD40 para unirse.

15 Se sintetizaron los genes de las quimeras humana/de ratón del CD40 (GenScript). Se diseñaron las diferentes quimeras intercambiando dominios o módulos del CD40 humano con los dominios o módulos correspondientes del CD40 de ratón. Las quimeras se diseñaron después de la evaluación de las secuencias de ratón y humanas y el análisis en 3D del CD40 humano. Las construcciones se clonaron en un vector pcDNA3.1 (Invitrogen) utilizando los sitios de restricción para NotI e HindIII. Las quimeras de ratón/humana se transfectaron transitoriamente en células 293-F Freestyle (Invitrogen), se incubaron durante 48 horas en el medio de expresión Freestyle 293 (Invitrogen) a 37 °C, un 8 % de CO₂, 135 rpm. Se confirmó la expresión con los anticuerpos policlonales CD40 humanos o de ratón.

25 Las células transfectadas se incubaron con los anticuerpos anti-CD40 de ensayo, el CD40L humano (hCD40L, R&D Systems), CD40L de ratón (mCD40L, R&D Systems) y los controles durante 30 min a 4 °C y luego se detectaron con α-hulgG-PE (Jackson ImmunoResearch) 30 min a 4 °C. Las células se analizaron con FACS Verse (BD Biosciences). Se determinó la unión a las diferentes construcciones quiméricas con MFI que era positiva (+) o negativa (-). Los resultados se muestran en la Tabla 9.

30 Ninguno de los anticuerpos anti-CD40 humano ensayados se unía al CD40 murino. Los anticuerpos ensayados se unían a al menos tres epítomos distintos. El primer epítomo se localiza en el módulo B del dominio 1 del CD40 (posiciones 38-59) y se hace referencia a este como D1B cuando se indica el "epítomo CD40" para los anticuerpos en el resumen de la Tabla 9. Los anticuerpos que se unen a este epítomo incluyen el 1132/1133 y 1150/1151. El segundo epítomo se localiza en el módulo A del dominio 2 del CD40 (posiciones 62 - 77) y se hace referencia a este como D2A en el resumen de la Tabla 9. Los anticuerpos que se unen a este epítomo incluyen el 1107/1108. El tercer epítomo se localiza en el módulo B del dominio 3 del CD40 (posiciones 122 - 143) y se hace referencia a este como D3B en el resumen de la Tabla 9. Los anticuerpos que se unen a este epítomo incluyen el 1140/1135.

Tabla 8

Construcción quimérica y nombre	Descripción de la construcción (secuencia de aminoácidos para el ratón la secuencia está entre paréntesis)	Clones de anticuerpo CD40			
		1107/1108	1132/1133	1140/1135	1150/1151
CD40 cys1 ratón	CD40 humano con el dominio de ratón 1 (25-60)	+	-	+	-
CD40 cys2 ratón	CD40 humano con el dominio de ratón 2 (61-103)	-	+	+	+
CD40 cys3 ratón	CD40 humano con el dominio de ratón 3 (104-144)	+	+	-	+
CD40 cys4 ratón	CD40 humano con el dominio de ratón 4 (145-187)	+	+	+	+
CD40 cys1A ratón	CD40 humano con el módulo de ratón A del dominio 1 (26-37)	+	+	+	+
CD40 cys1B ratón	CD40 humano con el módulo de ratón B del dominio 1 (38-59)	+	-	+	-
CD40 cys2A ratón	CD40 humano con el módulo de ratón A del dominio 2 (62-77)	-	+	+	+
CD40 cys2B ratón	CD40 humano con el módulo de ratón B del dominio 2 (80-103)	+	+	+	+
CD40 cys3A ratón	CD40 humano con el módulo de ratón A del dominio 3 (105-119)	+	+	+	+
CD40 cys3B ratón	CD40 humano con el módulo de ratón B del dominio 3 (122-143)	+	+	-	+
CD40 cys4A ratón	CD40 humano con el módulo de ratón A del dominio 4 (146-161)	+	+	+	+
CD40 cys4B ratón	CD40 humano con el módulo de ratón B del dominio 4 (164-186)	+	+	+	+

Los epítomos D1B, D2A y D3B se evaluaron adicionalmente para llevar a cabo una comparación detallada de las secuencias del CD40 humano y murino en las regiones relevantes de cada proteína. Esta comparación se muestra a continuación.

5

CD40 Posición 38-59 (D1B)
CSLCQPG**Q**KL**V**SDCT**E**FTE**T**EC - HUMANO
 CDLCQPGSRLTSHCTALEKTQC – RATÓN

10

CD40 Posición 62-77 (D2A)
CGEF**L**DTWNRE**T**HC - HUMANO
 CDSGEFSAQWNREIRC – RATÓN

15

CD40 Posición 122-143 (D3B)
HRSC**S**PGFG**V**K**Q**IAT**G**VSD**T**IC - HUMANO
 HTPCIPGFGVMEMATETDTVC – RATÓN

20

Los resultados del experimento de unión en este Ejemplo indican que, cuando todos los restos en negrita de un dominio de CD40 humano en particular se remplazan con los correspondientes aminoácidos murinos, los anticuerpos diseñados para unirse a ese dominio en particular pierden su capacidad para unirse. Algunos o todos estos restos particulares son por lo tanto necesarios para que estos anticuerpos se unan al CD40.

25

La siguiente Tabla 9 resumen las propiedades *in vitro* de los anticuerpos anti-CD40 ensayados en los Ejemplos anteriores.

Tabla 9

Propiedad <i>in vitro</i>	1150/1151	1107/1108	1146/1147	1148/1149	1132/1133
Bloqueo del CD40L (véase el Ejemplo 3)	-	++	+	+	+
Clase CDRH3 (véase el Ejemplo 3)	B	A	C	C	C
Epítopo CD40 (véase el Ejemplo 8)	D1B	D2A	NT	NT	D1B
KD de afinidad (M) x 10 ⁻⁹ (véase el Ejemplo 6)	1,5	1,3	NT	NT	2,4
Velocidad de asociación (ka) 1/Ms x 10 ⁶ (véase el Ejemplo 6)	2,2	1	NT	NT	3,4
Velocidad de disociación (kd) 1/s x 10 ⁻³ (véase el Ejemplo 6)	3,4	1,3	NT	NT	8,1
Proliferación de células B (véase el Ejemplo 3)	0,9	0,7	3,6	2,3	2,2
ELISA de unión al CD40 CE50 (ng/ml) (véase el Ejemplo 3)	41	34	580	2200	280
Reactividad cruzada con Cynomolgus (véase el Ejemplo 5)	Sí	Sí	NT	NT	Sí
Activación de DC (véase el Ejemplo 7)	7,8	22,3	NT	NT	10,8
Propiedad <i>in vitro</i>	1136/1137	1138/1135	1142/1135	1140/1135	1134/1135
Bloqueo de CD40L	+	-	-	-	-
Clase CDRH3	C	B	B	B	B
Epítopo CD40	NT	NT	NT	D3B	NT
KD de afinidad (M) x 10 ⁻⁹	11	NT	NT	3,9	3,4
Velocidad de asociación (ka) 1/Ms x 10 ⁶	0,9	NT	NT	1,1	0,4
Velocidad de disociación (kd)/s x 10 ⁻³	9,5	NT	NT	4,3	1,4
Proliferación de células B	1,0	4,5	1,5	0,4	1,0
ELISA de unión al CD40 CE50 (ng/ml)	1400	970	560	310	25
Reactividad cruzada con Cynomolgus	NT	NT	NT	Sí	Sí
Activación de DC	NT	NT	NT	NT	NT

Ejemplo 9 - Activación *in vivo* de células tumorales mieloides infiltrativas, incluyendo las células dendríticas, mediante anticuerpos anti-CD40 administrados por diferentes vías

Se utilizaron células de cáncer de vejiga MB49 para iniciar tumores en ratones hCD40Tg hembra de 8 semanas de edad (de cría propia). El día 0, se inocularon $0,25 \times 10^6$ células por vía subcutánea en el flanco derecho del ratón. El día 14, se inyectó a los ratones bien por vía intratumoral o por vía intraperitoneal un anticuerpo anti-CD40 de ensayo (un total de 1 μ g, 30 μ g de anticuerpo por ratón, o PBS; 4 ratones por grupo). El día 16, se sacrificaron 40 ratones por dislocación cervical. Se recolectaron los ganglios linfáticos de drenaje tumoral en medio completo y se agruparon dos tumores o ganglios linfáticos de cada grupo experimental. El tejido recolectado se homogeneizó enzimáticamente y mecánicamente utilizando Liberase TL (Roche) y filtros de malla de nailon (100 μ m; Fischer Scientific). Las membranas se lavaron completamente con medio RPMI que contenía 3-10 mM de EDTA y un 0,1 % de suero fetal bovino para preparar las suspensiones de células únicas. Las células aisladas se lavaron en PBS que contenía un 0,5 % de albúmina sérica bovina, y se bloqueó la unión inespecífica a Fc tratando las células con anti-CD16/32 de ratón (BD Biosciences).

Se analizaron por separado los niveles de expresión de CD86 (como un marcador para la activación) sobre las células positivas a CD11c y células positivas a CD11b mediante citometría de flujo. El CD11c es un marcador para células dendríticas. El CD11b se expresa en monocitos, macrófagos y subconjuntos de células dendríticas. Las células se tiñeron con la tinción fijable vivo/muerto FVS450 (BD Bioscience) y los anticuerpos específicos para CD11c-PE, CD11b-PECy7 y CD86-APC (BD Bioscience) diluidos 1:100. Después de la tinción de las células se fijaron en paraformaldehído utilizando Cellfix (BD Bioscience). La tinción de cada muestra se midió y calculo como CD86 (de la muestra)-FMO (de la muestra) y se presentó como el % de células positivas menos el control de PBS. Las células teñidas se analizaron utilizando FACS Verse (Becton Dickinson) y el software de análisis FlowJo vX. Los resultados se muestran en las Figuras 5 (células CD11c) y 6 (células CD11b).

Los datos de la Figura 5 muestran que el tratamiento con anticuerpo anti-CD40 aumentaba la activación de las células dendríticas medida por la expresión de CD86 en el tumor. En total, se obtenía una fuerte activación de células dendríticas en el tumor a continuación del tratamiento intratumoral (IT) en comparación con el tratamiento intraperitoneal (IP). Los datos de la Figura 6 muestran que el tratamiento con anticuerpo anti-CD40 aumentaba la activación de las células positivas a CD11b medida por la expresión de CD86 en el tumor. En total, se obtenía una fuerte activación de células positivas a CD11b en el tumor a continuación del tratamiento intratumoral (IT) en comparación con el tratamiento intraperitoneal (IP).

Ejemplo 10 - Efecto antitumoral *in vivo* en un modelo de cáncer de vejiga

Se estudiaron los anticuerpos anti-CD40 en cuanto a la actividad antitumoral *in vivo* en un cáncer carcinomatoso de células de vejiga murinas MB49 en ratones transgénicos del CD40 humano. Las células de cáncer de vejiga MB49 ($2,5 \times 10^5$) se inocularon mediante inyección de $2,5 \times 10^5$ células en el flanco el día 0 y se trataron los tumores de manera peritumoral con 30 μ g de anticuerpo o un isotipo de control apropiado el día 7 y 10. El crecimiento tumoral y la supervivencia se siguieron a lo largo del tiempo, midiendo los volúmenes tumorales los días 14, 17, 19 y 21. Se tomaron las mediciones del tumor (ancho, alto, largo) mediante un calibre y se calculó el volumen tumoral mediante la fórmula $a/2 \times l/2 \times a/2 \times \pi \times (4/3)$. Los animales se sacrificaron antes de que el volumen tumoral alcanzara los 2 cm³, cuando el tumor se ulceraba, o cuando la salud del animal estaba afectada. Los volúmenes tumorales relativos se determinaron calculando Tratados/Control (T/C) = 100 x (volumen tumoral medio del grupo tratado)/(volumen tumoral medio del grupo tratado con el isótopo de control). Los resultados se muestran en la Tabla 10. Los cambios del volumen tumoral se muestran en la Figura 7. Las tasas de supervivencia para los ratones tratados con 1132/1133 frente al control se muestran en la Figura 8.

En resumen, los anticuerpos ensayados 1132/1133, 1107/1108, y 1140/1135 presentaban actividad antitumoral. 1132/1133 y 1107/1108 generaron una actividad antitumoral significativa frente al control (ensayo t de Student).

Tabla 10

		D14	D17	D19	D21
Control	Media	77	113	114	173
	T/C	100 %	100 %	100 %	100 %
1132/1133	Media	48	41	41	40
	T/C	63 %	36 %	36 %	23 %
Control	Media	123	181	230	336
	T/C	100 %	100 %	100 %	100 %
1107/1108	Media	95	108	111	140
	T/C	78 %	60 %	48 %	42 %

(continuación)

Control	Media	96	147	176	232
	T/C	100 %	100 %	100 %	100 %
1140/1135	Media	92	109	117	144
	T/C	96 %	74 %	66 %	62 %

Ejemplo 11 - Los anticuerpos CD40 establecen una memoria inmunológica antitumoral *in vivo*

- 5 Los ratones tratados previamente con el cáncer de vejiga y que se curaron con los anticuerpos CD40 1140/1135, 1132/1132 o 1107/1108 se volvieron a desafiar con células de cáncer de vejiga. El tratamiento con anticuerpos CD40 demostró que había establecido una memoria inmunológica para el cáncer de vejiga y por lo tanto inmunidad contra los tumores cuando los animales se volvieron a desafiar.
- 10 Para este experimento, se llevó a cabo un nuevo desafío con MB49 mediante la inyección de $2,5 \times 10^5$ células en el flanco de ratones hCD40tg que se habían curado previamente de tumores MB49 por el tratamiento con los anticuerpos CD40 1140/1135, 1132/1132 o 1107/1108 (como en el Ejemplo 10). Se utilizaron ratones hCD40tg intactos (es decir, no tratados previamente con anticuerpos CD40 ni inoculados con células tumorales) como controles. Se midió el crecimiento tumoral mediante un calibre y se siguió la supervivencia a lo largo del tiempo
- 15 como en el Ejemplo 10.

Como se muestra en la Figura 9, los ratones tratados previamente desafiados de nuevo tenían un 100 % de supervivencia y un volumen tumoral muy bajo/cero. Por lo tanto, los datos demuestran que el tratamiento con anticuerpos CD40 induce inmunidad al nuevo desafío con el tumor MB49 en ratones hCD40tg. Esto demuestra la

20 presencia de memoria inmunológica. Este resultado es significativo ya que dicha memoria inmunológica es necesaria para establecer un efecto del tratamiento a largo plazo particularmente contra tumores metastáticos.

Ejemplo 12 - Resumen de la información de secuencias

- 25 Para cada anticuerpo descrito continuación, se subrayan las CDR de las secuencias de aminoácidos. Las CDR se identificaron utilizando el sistema de numeración IMGT (<http://www.imgt.org/>)

Anticuerpo 1146/1147**30 Secuencia de aminoácidos variable de la cadena pesada (Vh) - SEQ ID NO: 61**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT
ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVFGFDYWGQGTLVTVSS

35 Secuencia de aminoácidos variable de la cadena ligera (Vl) - SEQ ID NO: 62

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQKPKGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISSLPEDFATYYCQQYYYYPFTFGQGTKLEIK

40 Secuencias de aminoácidos de CDR

V_H CDR: CDR1: GFTFSSYA [SEQ ID NO: 1]
CDR2: ISGSGGST [SEQ ID NO: 2]
CDR3: ARRVFGFDY [SEQ ID NO: 3]
V_L CDR: CDR1: QSISSY [SEQ ID NO: 4]
CDR2: AAS [SEQ ID NO: 5]
CDR3: QYYYYYPFT [SEQ ID NO: 6]

Secuencia de nucleótidos variable de la cadena pesada (Vh) - SEQ ID NO: 81

45 GAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGCCTCTCCTGTGCA
GCCAGCGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAG
TGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCCACC
ATCTCCCGTGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCT
50 GTATATTATTGTGCGCGCCGTGTTTTCGGTTTTGACTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC
TCA

Secuencia de nucleótidos variable de la cadena ligera (VI) - SEQ ID NO: 82

5 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACCGCGTCACCATCACTTGC
 CGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTC
 CTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGAAAGCGGGACA
 GATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTGTCAACAGTACTAC
 TACTACCCGTTCACTTTTGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

Anticuerpo 1142/1135

Secuencia de aminoácidos variable de la cadena pesada (Vh) - SEQ ID NO: 63

10 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT
 15 ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPAYSTVLDYWGQGLTVTVSS

Secuencia de aminoácidos variable de la cadena ligera (VI) - SEQ ID NO: 64

20 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGT
 DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKLEIK

Secuencias de aminoácidos de CDR

V _H CDR:	CDR1:	GFTFSSYA [SEQ ID NO: 7]
	CDR2:	ISGSGGST [SEQ ID NO: 8]
	CDR3:	ARGPAYSTVLDY [SEQ ID NO: 9]
V _L CDR:	CDR1:	QSISSY [SEQ ID NO: 10]
	CDR2:	AAS [SEQ ID NO: 11]
	CDR3:	QQSYSTPYT [SEQ ID NO: 12]

Secuencia de nucleótidos variable de la cadena pesada (Vh) - SEQ ID NO: 83

25 GAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGCCTCTCCTGTGCA
 GCCAGCGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAG
 TGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACC
 30 ATCTCCCGTGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCT
 GTATATTATTGTGCGCGCGGTCCGGCTTACTCTACTGTTTTGGACTATTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTC
 ACCGTCTCCTCA

Secuencia de nucleótidos variable de la cadena ligera (VI) - SEQ ID NO: 84

35 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACCGCGTCACCATCACTTGC
 CGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTC
 CTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGAAAGCGGGACA
 40 GATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTGTCAACAGAGTTAC
 AGTACCCCTTATACTTTTGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

Anticuerpo 1132/1133

Secuencia de aminoácidos variable de la cadena pesada (Vh) - SEQ ID NO: 65

45 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIGSYGGGTYYADSVKGRFT
 ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYVNFQMDYWGQGLTVTVSS

Secuencia de aminoácidos variable de la cadena ligera (VI) - SEQ ID NO: 66

50 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGT
 DFTLTISLQPEDFATYYCQQYGRNPPTFGQGTKLEIK

Secuencias de aminoácidos de CDR

V _H CDR:	CDR1:	GFTFSSYA [SEQ ID NO: 13]
	CDR2:	IGSYGGGT [SEQ ID NO: 14]

CDR3: ARYVNFMDY [SEQ ID NO: 15]
 V_L CDR: CDR1: QSISSY [SEQ ID NO: 16]
 CDR2: AAS [SEQ ID NO: 17]
 CDR3: QQYGRNPPT [SEQ ID NO: 18]

Secuencia de nucleótidos variable de la cadena pesada (Vh) - SEQ ID NO: 85

5 GAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGCCTCTCCTGTGCA
 GCCAGCGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAG
 TGGGTCTCAGGTATTGGTTCTTACGGTGGTGGTACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCCACC
 ATCTCCCGTGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCT
 10 GTATATTATTGTGCGCGCTACGTTAACTTCGGTATGGACTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
 TCCTCA

Secuencia de nucleótidos variable de la cadena ligera (VI) - SEQ ID NO: 86

15 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACCGCGTCACCATCACTTGC
 CGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTC
 CTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGAAGCGGGACA
 GATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGAACCTTACTGTCAACAGTACGGT
 CGTAACCCGCCCACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAA

Anticuerpo 1148/1149

Secuencia de aminoácidos variable de la cadena pesada (Vh) - SEQ ID NO: 67

20 EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWWSAISGSGGSTYYADSVKGRFT
 25 ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAVFGFDYWGQGLTVVSS

Secuencia de aminoácidos variable de la cadena ligera (VI) - SEQ ID NO: 68

30 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGT
 DFTLTISLQPEDFATYYCQQAYYFPHTFGQGTKLEIK

Secuencias de aminoácidos de CDR

V_H CDR: CDR1: GFTFSSYA [SEQ ID NO: 19]
 CDR2: ISGSGGST [SEQ ID NO: 20]
 CDR3: ARAVFGFDY [SEQ ID NO: 21]
 V_L CDR: CDR1: QSISSY [SEQ ID NO: 22]
 CDR2: AAS [SEQ ID NO: 23]
 CDR3: QQAYYFPHT [SEQ ID NO: 24]

Secuencia de nucleótidos variable de la cadena pesada (Vh) - SEQ ID NO: 87

35 GAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGCCTCTCCTGTGCA
 GCCAGCGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAG
 TGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCCACC
 40 ATCTCCCGTGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCT
 GTATATTATTGTGCGCGCGCTGTTTTCGGTTTTGACTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC TCA

Secuencia de nucleótidos variable de la cadena ligera (VI) - SEQ ID NO: 88

45 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACCGCGTCACCATCACTTGC
 CGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTC
 CTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGAAGCGGGACA
 GATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGAACCTTACTGTCAACAGGCTTAC
 TACTTCCCGCACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAA

Anticuerpo 1138/1135

Secuencia de aminoácidos variable de la cadena pesada (Vh) - SEQ ID NO: 69

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT
ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFVYSSYIDYWGQGLTVTVSS

5 **Secuencia de aminoácidos variable de la cadena ligera (VI) - SEQ ID NO: 70**

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKLEIK

10 **Secuencias de aminoácidos de CDR**

V _H CDR:	CDR1:	GFTFSSYA [SEQ ID NO: 25]
	CDR2:	ISGSGGST [SEQ ID NO: 26]
	CDR3:	ARGFVYSSYIDY [SEQ ID NO: 27]
V _L CDR:	CDR1:	QSISSY [SEQ ID NO: 28]
	CDR2:	AAS [SEQ ID NO: 29]
	CDR3:	QQSYSTPYT [SEQ ID NO: 30]

Secuencia de nucleótidos variable de la cadena pesada (Vh) - SEQ ID NO: 89

15 GAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGCCTCTCCTGTGCA
GCCAGCGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAG
TGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACC
ATCTCCCGTGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCT
20 GTATATTATTGTGCGCGCGGTTTCGTTTACTCTTCTTACATTGACTATTGGGGCCAGGGAACCTGGTC
ACCGTCTCCTCA

Secuencia de nucleótidos variable de la cadena ligera (VI) - SEQ ID NO: 90

25 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACCGCGTCACCATCACTTGC
CGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTC
CTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGCCAGTGGAAGCGGGACA
GATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTGTCAACAGAGTTAC
AGTACCCCTTATACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

30 **Anticuerpo 1134/1135**

Secuencia de aminoácidos variable de la cadena pesada (Vh) - SEQ ID NO: 71

35 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIYSGGGGTSYADSVKGRFT
ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPAYSSFFDYWGQGLTVTVSS

Secuencia de aminoácidos variable de la cadena ligera (VI) - SEQ ID NO: 72

40 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKLEIK

Secuencias de aminoácidos de CDR

V _H CDR:	CDR1:	GFTFSSYA [SEQ ID NO: 31]
	CDR2:	IYSGGGGT [SEQ ID NO: 32]
	CDR3:	ARGPAYSSFFDY [SEQ ID NO: 33]
V _L CDR:	CDR1:	QSISSY [SEQ ID NO: 34]
	CDR2:	AAS [SEQ ID NO: 35]
	CDR3:	QQSYSTPYT [SEQ ID NO: 36]

45 **Secuencia de nucleótidos variable de la cadena pesada (Vh) - SEQ ID NO: 91**

50 GAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGCCTCTCCTGTGCA
GCCAGCGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAG
TGGGTCTCATCTATTTACTCTGGTGGTGGTGGTACATCTTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACC
ATCTCCCGTGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCT

GTATATTATTGTGCGCGCGGTCCGGCTTACTCTTCTTTCTTTGACTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC
ACCGTCTCCTCA

Secuencia de nucleótidos variable de la cadena ligera (VI) - SEQ ID NO: 92

5 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACCGCGTCACCATCACTTGC
CGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAAGCCCCTAAGCTC
CTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGAAGCGGGACA
10 GATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGAGTTAC
AGTACCCCTTATACTTTTGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

Anticuerpo 1136/1137

Secuencia de aminoácidos variable de la cadena pesada (Vh) - SEQ ID NO: 73

15 EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT
ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYVFGIDYWGQGLTVVSS

Secuencia de aminoácidos variable de la cadena ligera (VI) - SEQ ID NO: 74

20 DIQMTQSPSSLSASVGRVITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQAYYAGLFTFGQGTKLEIK

Secuencias de aminoácidos de CDR

25 V_H CDR: CDR1: GFTFSSYA [SEQ ID NO: 37]
CDR2: ISGSGGST [SEQ ID NO: 38]
CDR3: ARYVFGIDY [SEQ ID NO: 39]
V_L CDR: CDR1: QSISSY [SEQ ID NO: 40]
CDR2: AAS [SEQ ID NO: 41]
CDR3: QQAYYAGLFT [SEQ ID NO: 42]

Secuencia de nucleótidos variable de la cadena pesada (Vh) - SEQ ID NO: 93

30 GAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGCCTCTCCTGTGCA
GCCAGCGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAG
TGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACC
ATCTCCCGTGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCT
GTATATTATTGTGCGCGCTACGTTTTCGGTATTGACTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC
35 TCA

Secuencia de nucleótidos variable de la cadena ligera (VI) - SEQ ID NO: 94

40 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACCGCGTCACCATCACTTGC
CGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAAGCCCCTAAGCTC
CTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGAAGCGGGACA
GATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGGCTTAC
TACGCTGGTCTGTTCACTTTTGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATAAAA

Anticuerpo 1140/1135

Secuencia de aminoácidos variable de la cadena pesada (Vh) - SEQ ID NO: 75

50 EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT
ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPVYSSVFDYWGQGLTVVSS

Secuencia de aminoácidos variable de la cadena ligera (VI) - SEQ ID NO: 76

55 DIQMTQSPSSLSASVGRVITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKLEIK

Secuencias de aminoácidos de CDR

V_H CDR: CDR1: GFTFSSYA [SEQ ID NO: 43]
 CDR2: ISGSGGST [SEQ ID NO: 44]
 CDR3: ARGPVYSSVFDY [SEQ ID NO: 45]
 V_L CDR: CDR1: QSISY [SEQ ID NO: 46]
 CDR2: AAS [SEQ ID NO: 47]
 CDR3: QQSYSTPYT [SEQ ID NO: 48]

Secuencia de nucleótidos variable de la cadena pesada (Vh) - SEQ ID NO: 95

5 GAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGCCTCTCCTGTGCA
 GCCAGCGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAG
 TGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACC
 ATCTCCCGTGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCT
 10 GTATATTATTGTGCGCGCTCCGTTTACTCTTCTGTTTTGACTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC
 ACGTCTCCTCA

Secuencia de nucleótidos variable de la cadena ligera (VI) - SEQ ID NO: 96

15 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACCGCGTCACCATCACTTGC
 CGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTC
 CTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGCCAGTGGAAGCGGGACA
 GATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTGTCAACAGAGTTAC
 20 AGTACCCCTTACTTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

Anticuerpo 1150/1151

Secuencia de aminoácidos variable de la cadena pesada (Vh) - SEQ ID NO: 77

25 EVQLLES^{GGGLVQPGGSLRLS}CAASGFTFSSYAMS^{WVRQAPGKGLEWVSGIGGSSSYT}SYADSVKGRFT
 ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYSYHMDYWGQGLTVTVSS

Secuencia de aminoácidos variable de la cadena ligera (VI) - SEQ ID NO: 78

30 DIQMTQSPSSLSASVGDHVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGT
 DFTLTISLQPEDFATYYCQQYGSAPPTFGQGTKLEIK

Secuencias de aminoácidos de CDR

V_H CDR: CDR1: GFTFSSYA [SEQ ID NO: 49]
 CDR2: IGGSSSYT [SEQ ID NO: 50]
 CDR3: ARYYSYHMDY [SEQ ID NO: 51]
 V_L CDR: CDR1: QSISY [SEQ ID NO: 52]
 CDR2: AAS [SEQ ID NO: 53]
 CDR3: QQYGSAPPT [SEQ ID NO: 54]

Secuencia de nucleótidos variable de la cadena pesada (Vh) - SEQ ID NO: 97

35 GAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGCCTCTCCTGTGCA
 GCCAGCGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAG
 TGGGTCTCAGGTATTGGTGGTTCTTCTTCTTACACATCTTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACC
 40 ATCTCCCGTGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCT
 GTATATTATTGTGCGCGCTACTACTTACCATATGGACTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
 TCCTCA

Secuencia de nucleótidos variable de la cadena ligera (VI) - SEQ ID NO: 98

45 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACCACGTCAACCATCACTTGC
 CGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTC
 CTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGCCAGTGGAAGCGGGACA
 GATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTGTCAACAGTACGGT
 50 TCTGCTCCGCCACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

Anticuerpo 1107/1108

Secuencia de aminoácidos variable de la cadena pesada (Vh) - SEQ ID NO: 79

5 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT
ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRVWGFFDYWGQGLTVTVSS

Secuencia de aminoácidos variable de la cadena ligera (Vl) - SEQ ID NO: 80

10 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNWYQQKPKGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISSLQPEDFATYYCQQYGVYPFTFGQGTKLEIK

Secuencias de aminoácidos de CDR

V _H CDR:	CDR1: GFTFSSYA [SEQ ID NO: 55]
	CDR2: ISGSGGST [SEQ ID NO: 56]
	CDR3: ARR VWGF DY [SEQ ID NO: 57]
V _L CDR:	CDR1: QSISSY [SEQ ID NO: 58]
	CDR2: AAS [SEQ ID NO: 59]
	CDR3: QQYGV YPFT [SEQ ID NO: 60]

15

Secuencia de nucleótidos variable de la cadena pesada (Vh) - SEQ ID NO: 99

GAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGCCTCTCCTGTGCA
GCCAGCGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAG
20 TGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTAGCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACC
ATCTCCCGTGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCT
GTATATTATTGTGCGCGCCGTGTTTGGGGTTTTGACTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC
TCAGG

Secuencia de nucleótidos variable de la cadena ligera (Vl) - SEQ ID NO: 100

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACCGCGTCACCATCACTTGC
CGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTC
CTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGAAGCGGGACA
30 GATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGAACCTTACTGTCAACAGTACGGT
GTTTACCCGTTCACTTTTGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

Regiones constantes a modo de ejemplo de anticuerpos de la invención

35

Secuencia de aminoácidos constante de la cadena pesada (Ch) (Iqy 2-4 HUMANA) - SEQ ID NO: 101

Publicada en Mueller J.P. et al. Molecular Immunology vol. 34 no. 6 pp 441-452, 1997

40 ASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPKPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDLMISRTP
TCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
PSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Secuencia de aminoácidos constante de la cadena pesada (Ch) (Iqy-1 Número de registro Uniprot: P01857 HUMANA) - SEQ ID NO: 102

45 ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTCPKPAPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISR
TPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
50 NKALPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de aminoácidos constante de cadena ligera (Cl) (región C de cadena de Iqy número de registro de Genbank: AAA58989.1 HUMANA) - SEQ ID NO: 103

55 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Los anticuerpos de la invención pueden incluir una región Fc (por ejemplo, una región constante de cadena pesada

o ligera) en la que se pueden introducir mutaciones, por ejemplo, para aumentar la afinidad por el FcγR y/o para disminuir la afinidad por el FcRn. El aumento de la afinidad por el FcγR puede dar como resultado el aumento de la actividad de un anticuerpo agonista anti-CD40. Por el contrario, la disminución de afinidad por el FcRn puede resultar en una disminución de la semivida, que puede ser ventajosa en el contexto del tratamiento del cáncer local, particularmente intratumoral. Ejemplos de dichas regiones Fc mutadas incluyen:

- Una región C_H de IgG1 con la mutación H435R;
- Una región C_H de IgG1 con las mutaciones H435R y S239D;
- Una región C_H de IgG1 con las mutaciones H435R y S239D e I322E; y
- Una región C_H de IgG1 con las mutaciones H435R y K290A.

La mutación H435R se basa en la presencia de R en la posición correspondiente de la región C_H de IgG3. Todas las posiciones de las mutaciones anteriores se numeran de acuerdo con el esquema de numeración EU de Kabat et al.

Diana del anticuerpo: la molécula de CD40 humana, miembro 5 de la superfamilia del receptor del TNF

SEQ ID NO: 104

MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPCGESEFLD
 TWNRETHCHQHXYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGV
 SDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCGPQDRRLRALVVIPIIFGILFA
 ILLVLVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQER
 Q

Regiones de unión a modo de ejemplo al CTLA-4

SEQ ID NO: 105 (región extracelular de tipo silvestre del CD86 humano)

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDVSVHVKYMGRTSFDS
 WTLRLHNLQIKDKGLYQCIIHHKKPTGMIRIHQMNSLSVLA

SEQ ID NO: 106 (variante de la SEQ ID NO: 105)

LKIQAYFNETADLPCQFANSQNSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKERFDAVDSKYMGRSFDSDSWT
 LRLHNLQIKDKGIYQCIIHHKKPSGMVKIHKMDSLSVLA

SEQ ID NO: 107 (variante de la SEQ ID NO: 105)

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNSLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKERFDSVDSKYMGRSFDSDS
 WTLRLHNLQIKDKGRYQCIIHHKKPTGMINIHKMNSLSVLA

SEQ ID NO: 108 (variante de la SEQ ID NO: 105)

APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNLTLSELVFWQDQENLVLNEVYLGKEKFDVSVSSKYMGRSFDSDS
 WTLRLHNLQIKDKGIYQCIIHHKKPTGMIKIHEMSSLSVLA

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ALLIGATOR BIOSCIENCE AB

<120> ANTICUERPOS

<130> N401669GB

<160> 108

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

Ala Arg Arg Val Phe Gly Phe Asp Tyr
1 5

15

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 4

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

25

<210> 5

<211> 3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 5

Ala Ala Ser
1

35

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

40

Gln Gln Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 7

<211> 8

45 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 7

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

50

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

55 <213> *Homo sapiens*

ES 2 785 206 T3

<400> 8

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

5 <210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 9

Ala Arg Gly Pro Ala Tyr Ser Thr Val Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 10

20

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 11
<211> 3
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 11

30

Ala Ala Ser
1

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 12

40

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 13
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45

<400> 13

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 14

Ile Gly Ser Tyr Gly Gly Gly Thr
 1 5

5 <210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 15

Ala Arg Tyr Val Asn Phe Gly Met Asp Tyr
 1 5 10

15 <210> 16
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 16

20 Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 17
 <211> 3
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*

<400> 17

Ala Ala Ser
 1

30 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 18

Gln Gln Tyr Gly Arg Asn Pro Pro Thr
 1 5

40 <210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 19

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

50 <210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

55 <400> 20

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

5 <210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 21

Ala Arg Ala Val Phe Gly Phe Asp Tyr
1 5

10

<210> 22
<211> 6
<212> PRT
15 <213> *Homo sapiens*

<400> 22

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

20

<210> 23
<211> 3
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
25

<400> 23

Ala Ala Ser
1

30 <210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 24

Gln Gln Ala Tyr Tyr Phe Pro His Thr
1 5

40 <210> 25
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 25

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

45

<210> 26
<211> 8
<212> PRT
50 <213> *Homo sapiens*

<400> 26

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

55

ES 2 785 206 T3

<210> 27
<211> 12
<212> PRT
5 <213> *Homo sapiens*

<400> 27

Ala Arg Gly Phe Val Tyr Ser Ser Tyr Ile Asp Tyr
1 5 10

10 <210> 28
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 28

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

20 <210> 29
<211> 3
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 29

Ala Ala Ser
1

30 <210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 30

35 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr
1 5

40 <210> 31
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 31

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

45 <210> 32
<211> 8
<212> PRT
50 <213> *Homo sapiens*

<400> 32

Ile Tyr Ser Gly Gly Gly Gly Thr
1 5

55 <210> 33
<211> 12

ES 2 785 206 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 33

5

Ala Arg Gly Pro Ala Tyr Ser Ser Phe Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 34
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 34

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

15

<210> 35
<211> 3
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 35

Ala Ala Ser
1

25

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30

<400> 36

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr
1 5

35

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40

<400> 37

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

45

<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 38

50

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

55

<210> 39
<211> 9
<212> PRT

ES 2 785 206 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 39

5 Ala Arg Tyr Val Phe Gly Ile Asp Tyr
1 5

<210> 40

<211> 6

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 40

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

15

<210> 41

<211> 3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 41

Ala Ala Ser
1

25

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 42

Gln Gln Ala Tyr Tyr Ala Gly Leu Phe Thr
1 5 10

35

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 43

40

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 44

<211> 8

45

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 44

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

50

<210> 45

<211> 12

<212> PRT

55

<213> *Homo sapiens*

<400> 45

Ala Arg Gly Pro Val Tyr Ser Ser Val Phe Asp Tyr

5 1 5 10

<210> 46
 <211> 6
 <212> PRT
 10 <213> *Homo sapiens*

<400> 46

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5

15 <210> 47
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 47

Ala Ala Ser
 1

25 <210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 48

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr
 1 5

35 <210> 49
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 49

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

45 <210> 50
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 50

Ile Gly Gly Ser Ser Ser Tyr Thr
 1 5

50 <210> 51
 <211> 10
 <212> PRT
 55 <213> *Homo sapiens*

<400> 51

ES 2 785 206 T3

Ala Arg Tyr Tyr Ser Tyr His Met Asp Tyr
 1 5 10

5 <210> 52
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 52

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5

15 <210> 53
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 53

Ala Ala Ser
 1

20 <210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*

<400> 54

Gln Gln Tyr Gly Ser Ala Pro Pro Thr
 1 5

30 <210> 55
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 55

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

40 <210> 56
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 56

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
 1 5

50 <210> 57
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

55 <400> 57

Ala Arg Arg Val Trp Gly Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 58
 <211> 6
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 58

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5

10
 <210> 59
 <211> 3
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 59

Ala Ala Ser
 1

20
 <210> 60
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 60

Gln Gln Tyr Gly Val Tyr Pro Phe Thr
 1 5

30 <210> 61
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 61

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

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

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

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

ES 2 785 206 T3

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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 Arg Val Phe Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 62
 <211> 107
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 62

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 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

10
 <210> 63
 <211> 119
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 63

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

20

ES 2 785 206 T3

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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 Gly Pro Ala Tyr Ser Thr Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 64
 <211> 107
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 64

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 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

ES 2 785 206 T3

<210> 65
 <211> 117
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*

<400> 65

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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 Tyr Val Asn Phe Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

10 <210> 66
 <211> 107
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 66

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 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

ES 2 785 206 T3

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Arg Asn Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 67

<211> 116

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 67

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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 Ala Val Phe Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

10

<210> 68

<211> 107

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 68

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 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

ES 2 785 206 T3

<211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 70

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

<210> 71
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 71

15

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

ES 2 785 206 T3

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 72
 <211> 107
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 72

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 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

10
 <210> 73
 <211> 116
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 73

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

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

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

20

ES 2 785 206 T3

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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 Tyr Val Phe Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 74

<211> 108

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 74

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 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Tyr Tyr Ala Gly Leu
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

10

<210> 75

<211> 119

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 75

ES 2 785 206 T3

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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 Gly Pro Val Tyr Ser Ser Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 76
 <211> 107
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 76

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 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr
 85 90 95

10

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 77
 <211> 117
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 77

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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 Tyr Tyr Ser Tyr His Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

10 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 78
 <211> 107
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 78

ES 2 785 206 T3

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

Asp His Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ala Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

- 5 <210> 79
- <211> 116
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*

- 10 <400> 79

ES 2 785 206 T3

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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 Arg Val Trp Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 80

<211> 107

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 80

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

10

ES 2 785 206 T3

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Val Tyr Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 81
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 81

gaggtgcagc tgttggagag cgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgogoctc 60
 tctgtgcag ccagcggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg ggtcggagt ggtctcagct attagtggtg gtggtggtag cacatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgtagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acggctgtat attattgtgc gcgcegtgtt 300
 ttcggttttg actattgggg ccaggaacc ctggtcaccg tctoctca 348

10

<210> 82
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 82

gacatccaga tgaccagtc tocatoctcc ctgagcgcac ctgtaggaga ccgctcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggaag cgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tactactact acccgttcac ttttgccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

20

ES 2 785 206 T3

<210> 83
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 83

gaggtgcagc tgttggagag cgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgcctc 60
tcctgtgcag ccagcggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtgggtgtag cacatactat 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgtgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acggctgtat attattgtgc gcgcgggtccg 300
gcttactcta ctgttttggga ctattggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

10 <210> 84
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 84

gacatocaga tgaccocagtc tccatcctcc ctgagcgcac ctgtaggaga ccgcgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggaag cgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttatta ctgtcaacag agttacagta ccccttatac ttttgccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

20 <210> 85
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 85

gaggtgcagc tgttggagag cgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgcctc 60
tcctgtgcag ccagcggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attggttctt acgggtggtg tacatactat 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgtgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acggctgtat attattgtgc gcgctaogtt 300
aacttcggta tggactattg gggccaggga accctgggtca ccgtctctc a 351

30 <210> 86
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 785 206 T3

<400> 86

gacatccaga tgaccocagtc tocatocctcc ctgagcgcac ctgtaggaga ccgcgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggaag cgggacagat ttcactctca ccatcagcag totgcaacct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tacggtcgta acccgcccac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

5 <210> 87
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 87

gaggtgcagc tgttggagag cgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgcctc 60
 toctgtgcag ccagcggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtgggtgtag cacatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgtagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acggctgtat attattgtgc gcgcgctgtt 300
 ttcggttttg actattgggg ccaggggaacc ctggtcacog tctoctca 348

15 <210> 88
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 88

gacatccaga tgaccocagtc tocatocctcc ctgagcgcac ctgtaggaga ccgcgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggaag cgggacagat ttcactctca ccatcagcag totgcaacct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacag gcttactact tcccgcacac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

25 <210> 89
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 89

ES 2 785 206 T3

gaggtgcagc tgttggagag cgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgctc 60
 tcctgtgcag ccagcggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg ggctggagt ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgtagca attccaagaa caogctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acggctgtat attattgtgc gcgcggtttc 300
 gtttactctt cttacattga ctattggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

5 <210> 90
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 90

gacatccaga tgaccagtc tccatcctoc ctgagcgcac ctgtaggaga ccgcgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcacccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggaag cgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacag agttacagta ccccttatac ttttgccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

15 <210> 91
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 91

gaggtgcagc tgttggagag cgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgctc 60
 tcctgtgcag ccagcggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg ggctggagt ggtctcatct atttactctg gtggtggtgg tacatcttat 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgtagca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acggctgtat attattgtgc gcgcggctccg 300
 gcttactctt ctttctttga ctattggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

25 <210> 92
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 92

ES 2 785 206 T3

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgagcgcat ctgtaggaga ccgcgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggaag cgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacag agttacagta ccccttatac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 93
 <211> 348
 5 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 93

gaggtgcagc tgttgagag cgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgctc 60
 tcctgtgcag ccagcggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgtgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acggctgtat attattgtgc gcgctacgtt 300
 10 ttcgggtattg actattgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcctca 348

<210> 94
 <211> 324
 15 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 94

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgagcgcat ctgtaggaga ccgcgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggaag cgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacag gcttactacg ctggtctggt cacttttggc 300
 caggggacca agctggagat aaaa 324

<210> 95
 <211> 357
 20 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 95

ES 2 785 206 T3

gaggtgcagc tgttggagag cgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgcgcctc 60
 tcctgtgcag ccagcggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg ggctggagt ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgtagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acggctgtat attattgtgc gcgcggtccg 300
 gtttactctt ctgtttttga ctattggggc caggaacce tggtcaccgt ctctca 357

<210> 96
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 96

gacatccaga tgaccagtc tocatctcc ctgagcgcac ctgtaggaga ccgcgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcaccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggaag cgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacag agttacagta ccccttatac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

10

<210> 97
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 97

gaggtgcagc tgttggagag cgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgcgcctc 60
 tcctgtgcag ccagcggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg ggctggagt ggtctcaggt attggtggtt cttcttctta cacatcttat 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgtagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acggctgtat attattgtgc gcgctactac 300
 tcttaccata tggactattg gggccagggg accctggtca cagtctctc a 351

20

<210> 98
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 98

ES 2 785 206 T3

gacatocaga tgaccocagtc tocatocctcc ctgagcgcac ctgtaggaga ccacgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggaag cgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tacggttctg ctccgccac ttttgccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 99
 <211> 350
 5 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 99

gaggtgcagc tgttgagag cgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgctc 60
 10 tctgtgcag ccagcggatt caccttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggaaggg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtgtag cacatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgtagca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acggctgtat attattgtgc gcgcctgtt 300
 tggggttttg actattgggg ccaggaacc ctggtcaccg tctcctcagg 350

<210> 100
 15 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 100

gacatocaga tgaccocagtc tocatocctcc ctgagcgcac ctgtaggaga ccgctcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggaag cgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tacgggtggtt acccgttcac ttttgccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 101
 25 <211> 326
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 101

ES 2 785 206 T3

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

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

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

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

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

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

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

ES 2 785 206 T3

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 102
 <211> 330
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 102

ES 2 785 206 T3

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

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

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

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

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

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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

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

ES 2 785 206 T3

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

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

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

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

5 <210> 103
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 103

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

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

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

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

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

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

15 <210> 104
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 104

ES 2 785 206 T3

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

Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu
20 25 30

Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val
35 40 45

Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu
50 55 60

Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His
65 70 75 80

Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr
85 90 95

Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
100 105 110

Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
115 120 125

Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
130 135 140

Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
145 150 155 160

Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln
165 170 175

Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu
180 185 190

Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile
195 200 205

Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn
210 215 220

Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp
225 230 235 240

Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His
245 250 255

ES 2 785 206 T3

Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser
 260 265 270

Val Gln Glu Arg Gln
 275

<210> 105
 <211> 111
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 105

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
 1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
 20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
 35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
 50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys
 65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile His His Lys Lys Pro Thr Gly
 85 90 95

Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala
 100 105 110

10
 <210> 106
 <211> 109
 <212> PRT
 15 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia del clon de unión al CTLA-4 número 904

20 <400> 106

Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro Cys Gln
 1 5 10 15

Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Ile Val Phe Trp
 20 25 30

ES 2 785 206 T3

Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly Lys Glu
 35 40 45

Arg Phe Asp Ala Val Asp Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser Phe Asp
 50 55 60

Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys Asp Lys
 65 70 75 80

Gly Ile Tyr Gln Cys Ile Ile His His Lys Lys Pro Ser Gly Met Val
 85 90 95

Lys Ile His Gln Met Asp Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala
 100 105

<210> 107
 <211> 111
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia del clon de unión al CTLA-4 número 1040

10 <400> 107

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
 1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
 20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
 35 40 45

Lys Glu Arg Phe Asp Ser Val Asp Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
 50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys
 65 70 75 80

Asp Lys Gly Arg Tyr Gln Cys Ile Ile His His Lys Lys Pro Thr Gly
 85 90 95

Met Ile Asn Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala
 100 105 110

15 <210> 108
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 785 206 T3

<220>

<223> Secuencia del clon de unión al CTLA-4 número 1044

<400> 108

5

```

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
1           5           10           15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Leu Thr Leu Ser Glu Leu Val Val
          20           25           30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
          35           40           45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val Ser Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
50           55           60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys
65           70           75

Asp Lys Gly Ile Tyr Gln Cys Ile Ile His His Lys Lys Pro Thr Gly
          85           90           95

Met Ile Lys Ile His Glu Met Ser Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala
          100           105           110
    
```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humano, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, específico del CD40 humano que comprende las CDR de:
- 5 (a) las SEQ ID NO 13, 14, 15, 16, 17 y 18 (CDR del anticuerpo 1132/1133); o
 (b) las SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5 y 6 (CDR del anticuerpo 1146/1147); o
 (c) las SEQ ID NO 19, 20, 21, 22, 23 y 24 (CDR del anticuerpo 1148/1149); o
 10 (d) las SEQ ID NO 37, 38, 39, 40, 41 y 42 (CDR del anticuerpo 1136/1137);
- en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo comprenden:
- 15 (i) una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a una secuencia de SEQ ID NO: 65, 61, 67 o 73; y
 (ii) una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a una secuencia de SEQ ID NO: 66, 62, 68 o 74.
2. Un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, que aumentan la actividad de una célula positiva al CD11c o una célula positiva al CD11b, lo que se indica por un aumento de la expresión del CD86 por dicha célula.
- 20 3. Un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo comprende:
- 25 (a) la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 65 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 66; o
 (b) la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 61 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 62; o
 30 (c) la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 67 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 68; o
 (d) la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 73 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 74.
4. Un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprenden una región Fc que es una región de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
- 35 5. Un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 4 que comprenden una región Fc que es una región de IgG1 o IgG4.
- 40 6. Un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 5 para su uso en un método para el tratamiento del cáncer.
7. Un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el método comprende la administración intratumoral del anticuerpo o del fragmento.
- 45 8. Un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 en donde el cáncer es un cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer de pulmón, cáncer de cuello uterino, rhabdomyosarcoma, neuroblastoma, mieloma múltiple, leucemia, leucemia linfoblástica aguda, melanoma, cáncer de vejiga, glioblastoma, linfoma o cáncer de piel.
- 50 9. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
10. Un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 5 conjugados con un resto adicional.
- 55 11. Una composición que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y al menos un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptables.

FIGURA 1

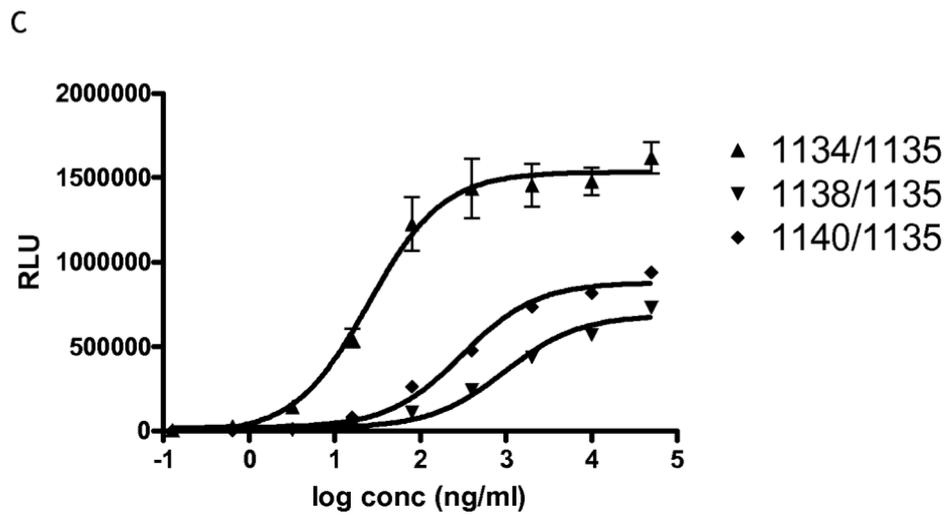
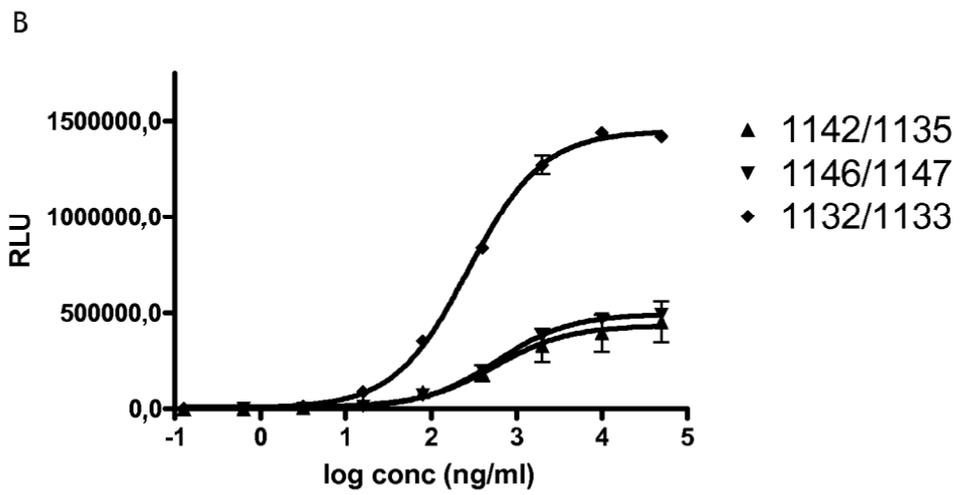
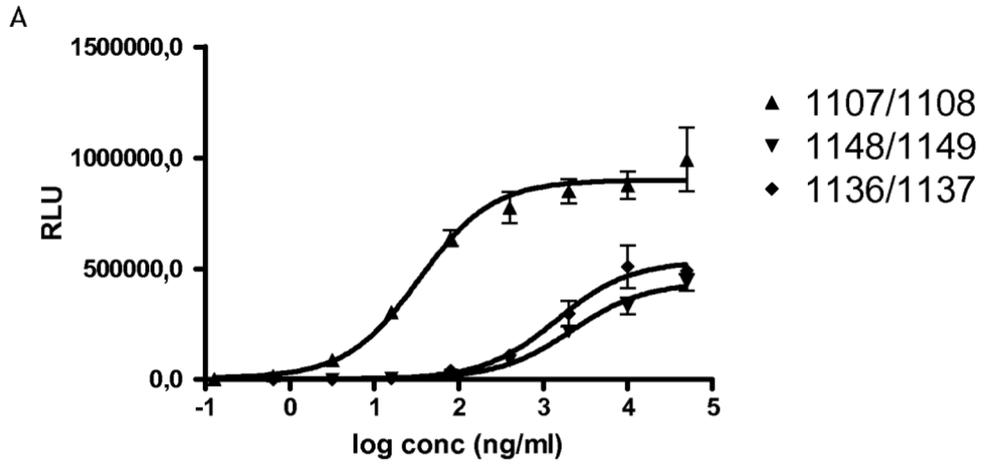


FIGURA 1 continuación

D

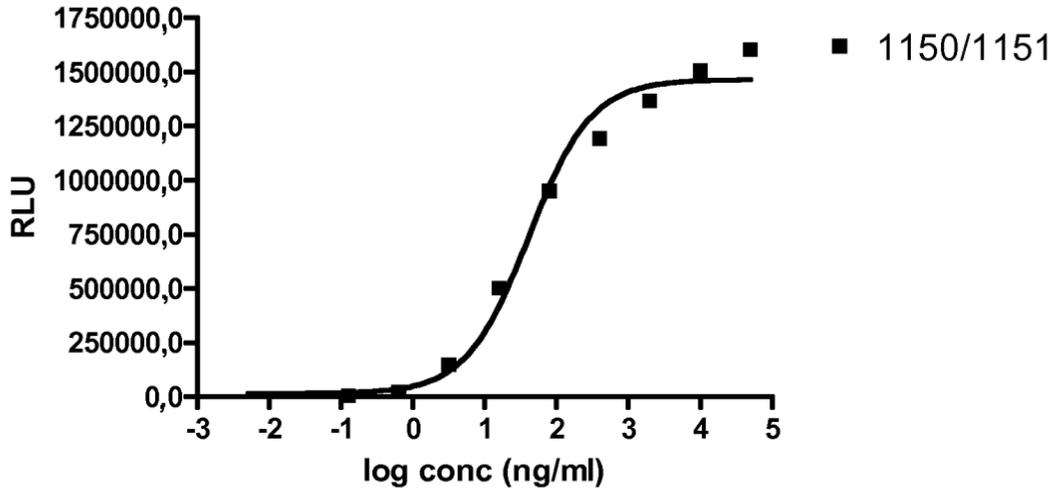


FIGURA 2

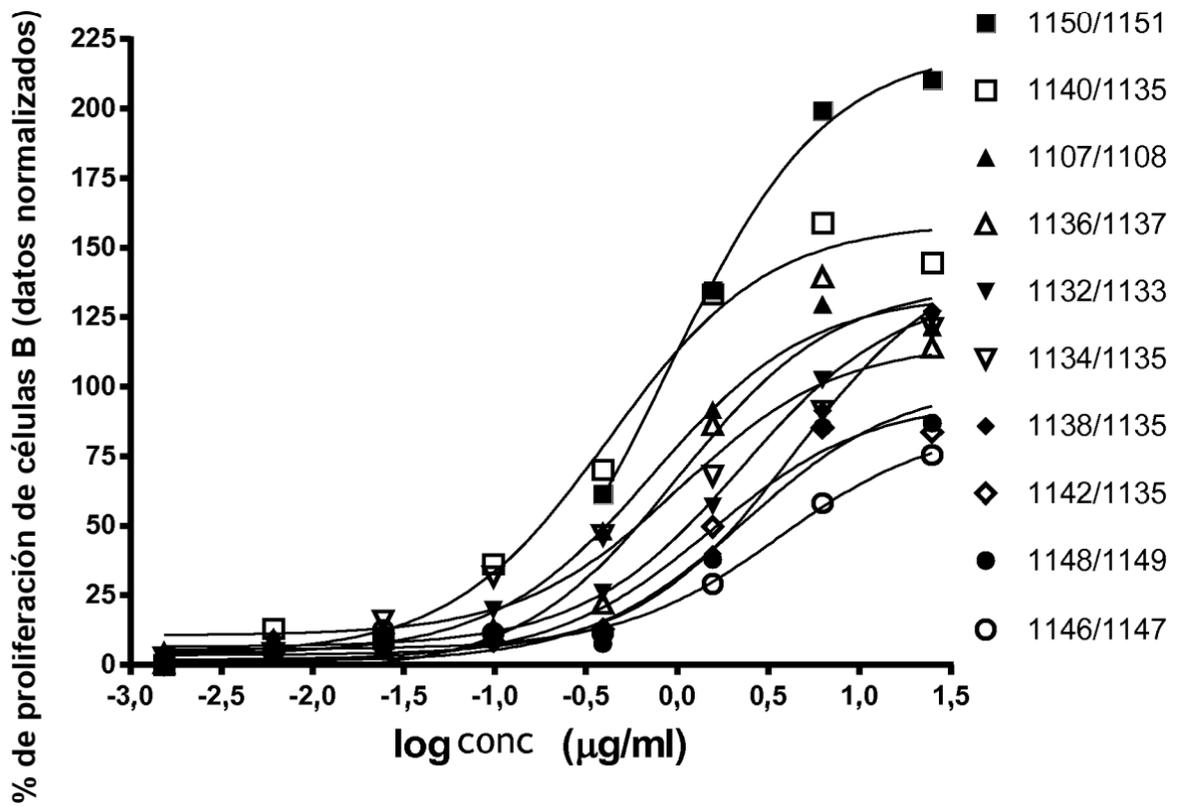


FIGURA 3

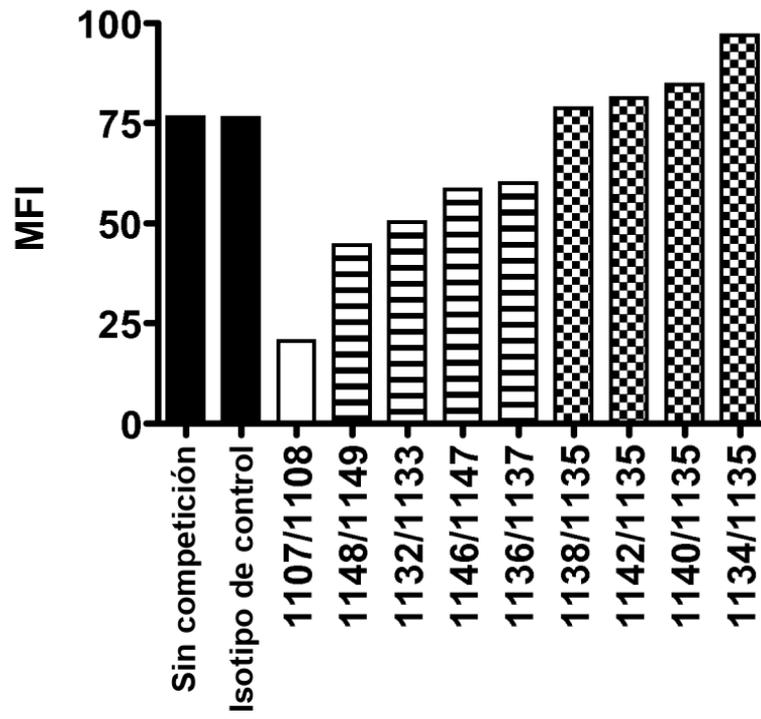


FIGURA 4

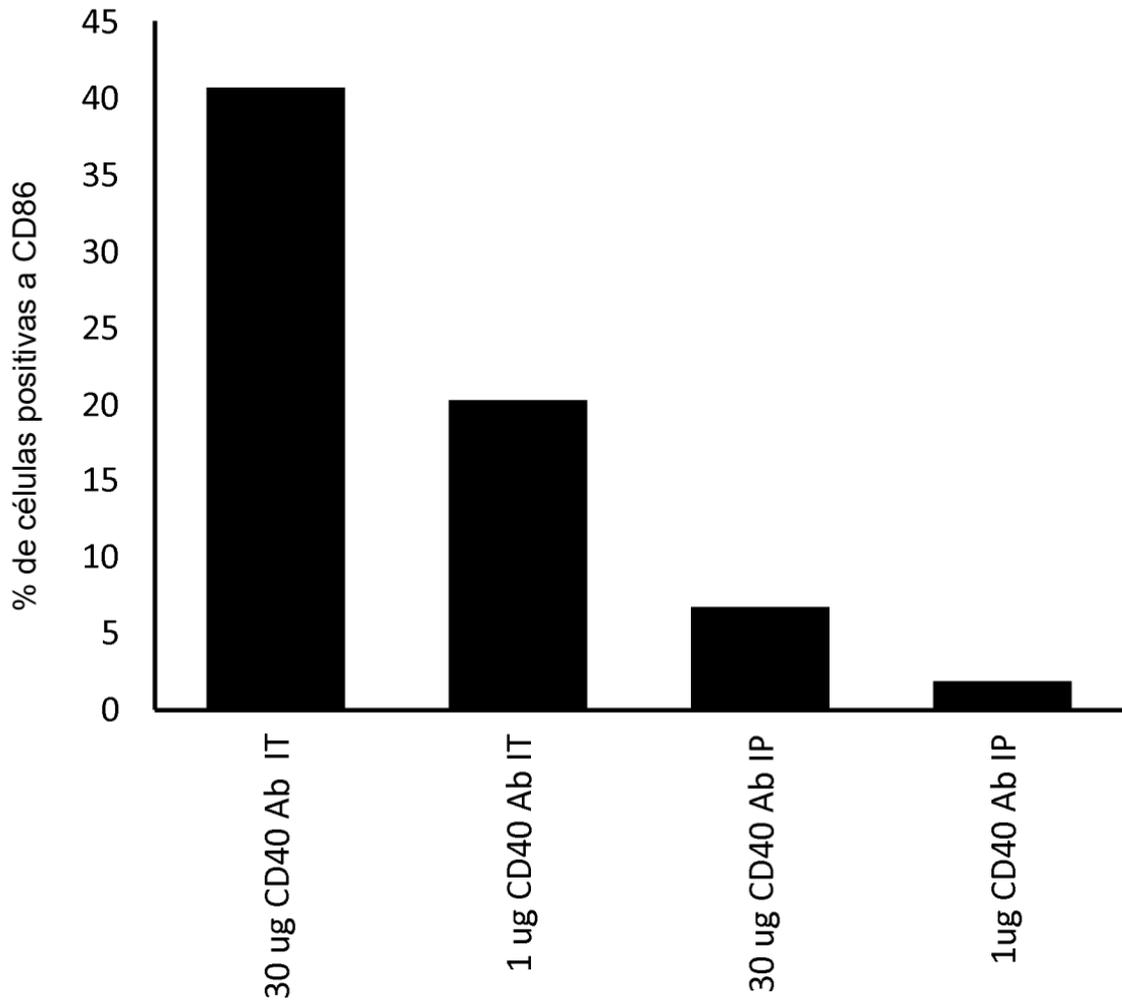


FIGURA 5

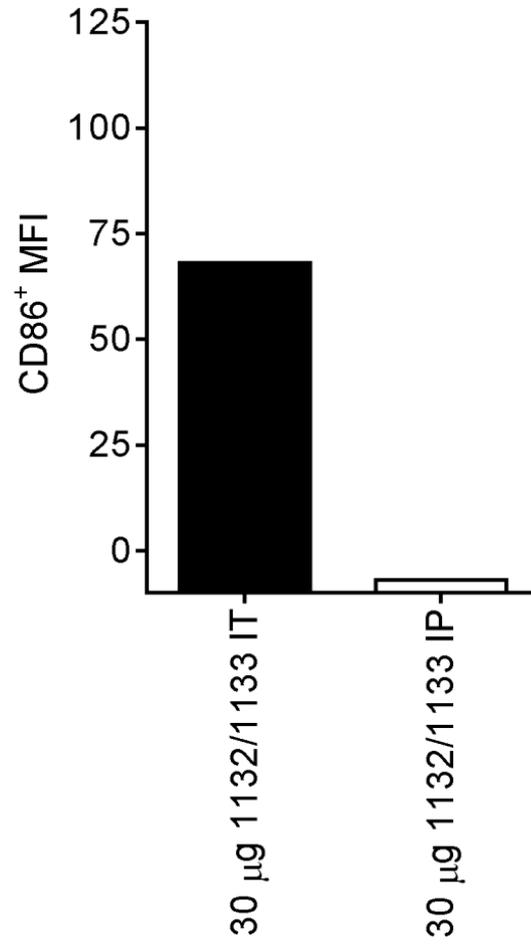


FIGURA 6

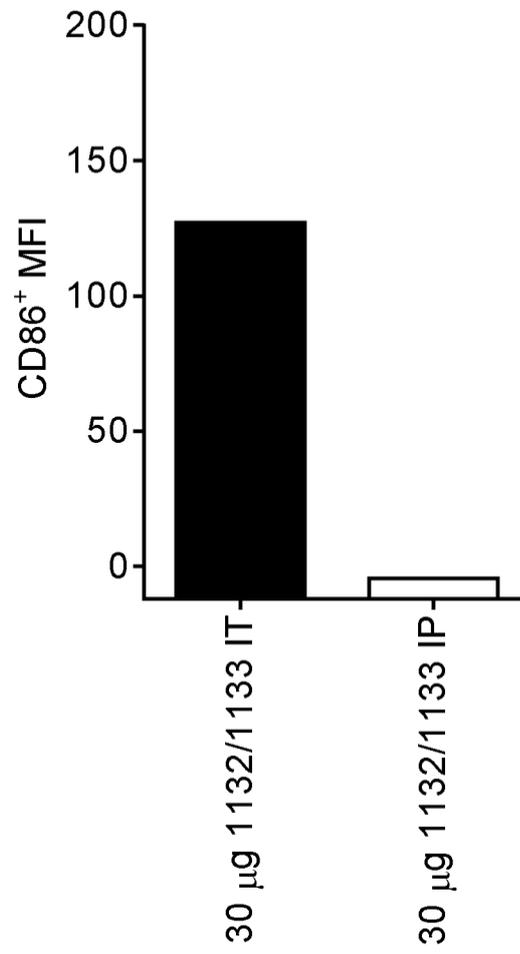


FIGURA 7

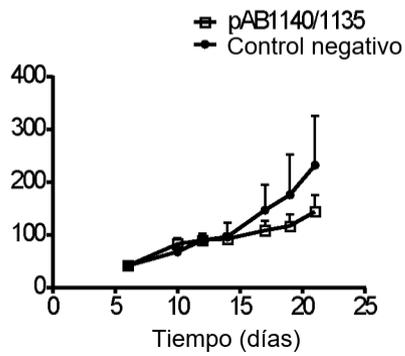
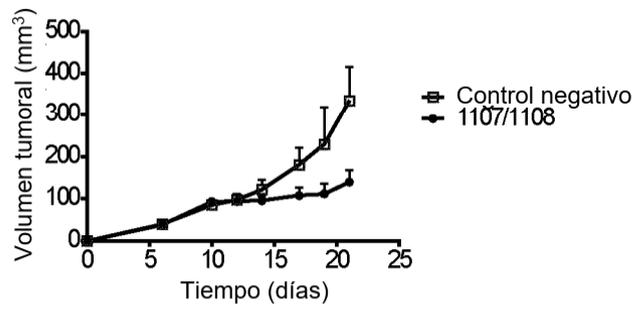
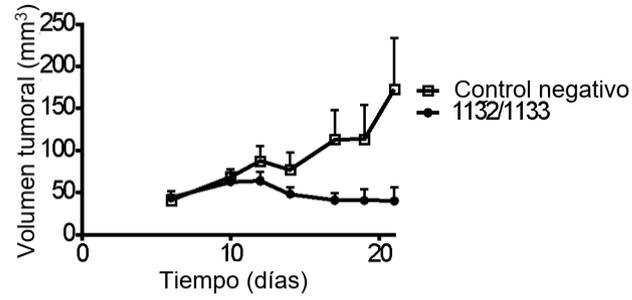


FIGURA 8

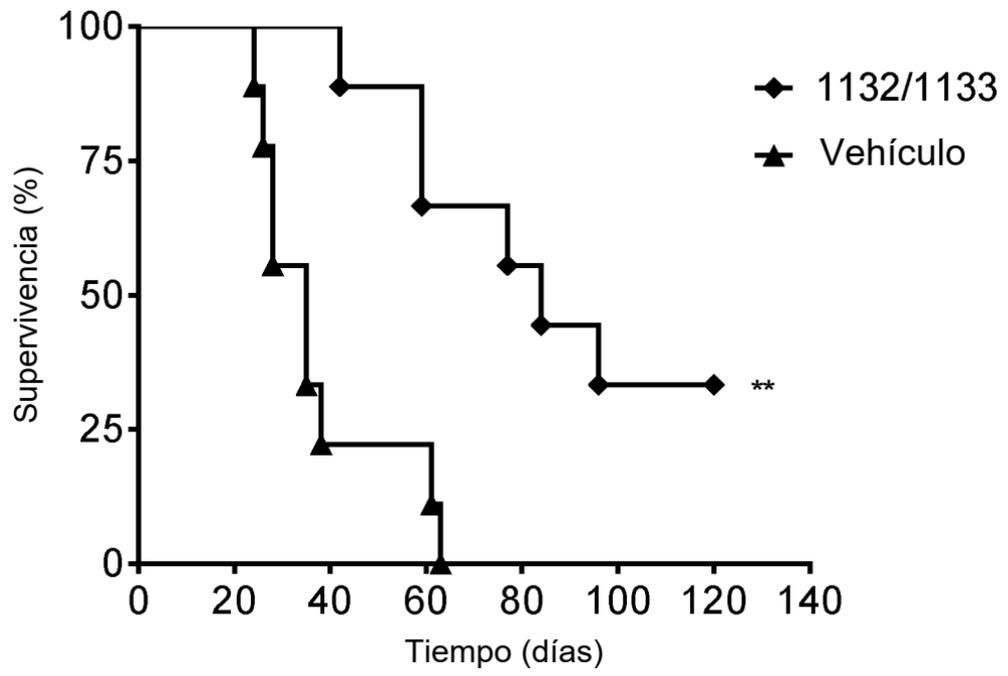


FIGURA 9

