

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 217**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61P 27/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2011 E 16206265 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 3178851**

54 Título: **Anticuerpos anti-CD40**

30 Prioridad:

31.03.2010 US 319574 P

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

22.02.2021

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL
GMBH (100.0%)
Binger Strasse 173
55216 Ingelheim am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

**BARRETT, RACHEL;
BRODEUR, SCOTT;
CANADA, KEITH A.;
LITZENBURGER, TOBIAS y
SINGH, SANJAYA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 807 217 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-CD40

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general a anticuerpos anti-CD40 humanizados para uso diagnóstico y terapéutico. Más específicamente, se describen anticuerpos anti-CD40 humanizados y su uso para el tratamiento de diversas enfermedades o trastornos caracterizados por células que expresan CD40. También se describen composiciones farmacéuticas y kits que comprenden el anticuerpo anti-CD40 humanizado.

Antecedentes de la invención

10 La CD40 es una glucoproteína de membrana integral de tipo 48kDa y un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF). La CD40 se expresa en una diversidad de tipos celulares que incluyen células B normales y neoplásicas, células interdigitantes, carcinomas, células epiteliales (p. ej., queratinocitos), fibroblastos (p. ej., sinoviocitos) y plaquetas. También está presente en monocitos, macrófagos, algunas células endoteliales y células dendríticas foliculares. La CD40 se expresa tempranamente en ontogenia de células B, apareciendo en
15 precursores de células B después de la aparición de CD10 y CD19, pero antes de la expresión de CD21, CD23, CD24, y de la aparición de inmunoglobulina superficial M (sIgM) (Uckun et al., 1990, Blood 15:2449). La CD40 también se ha detectado en células plasmáticas derivadas de célula ósea y de amígdalas (Pellat-Decounynck et al., 1994, Blood 84:2597).

20 El ligando de CD40 es CD40L (también denominado CD154, gp39, y TRAP), un miembro de la superfamilia de TNF. CD40L es una proteína transmembrana expresada predominantemente en células T CD4+ activadas y un pequeño subconjunto de células T CD8+ (revisado por Van Kooten C. y Banchereau, 2000).

25 La interacción de CD40 con CD40L induce respuestas inmunitarias mediadas por células y humorales. CD40 regula este par ligando-receptor para activar las células B y otras células presentadoras de antígenos (APC), incluidas las células dendríticas (DC) (revisado por (Toubi y Shoenfeld, 2004); (Kiener, et al., 1995). La función de CD40 en las células B ha sido estudiada profundamente. La activación de CD40 en células B induce la proliferación, la diferenciación en células secretoras de anticuerpos y el cambio de isotipo en los centros germinales de los órganos linfoides secundarios. En estudios *in vitro* se han observado efectos directos de la activación de CD40 sobre la producción de citocinas (IL-6, IL-10, TNF- α , LT- α), la expresión de moléculas de adhesión y receptores coestimuladores (ICAM, CD23, CD80 y CD86) y el aumento de la expresión de MHC clase I, MHC clase II y transportador TAP por linfocitos B (Liu, et al., 1996). Para la mayoría de estos procesos, la CD40 actúa en conjunto
30 con otras citocinas u otras interacciones receptor-ligando.

35 La señalización de CD40 en monocitos y CD da como resultado una supervivencia mejorada así como la secreción de citoquinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α y MIP-1 α). La ligadura de CD40 en estos APC también conduce a un aumento de las moléculas coestimuladoras tales como (ICAM-1, LFA-3, CD80 y CD86). La activación de receptores CD40 es una de las señales críticas que permiten la maduración completa de DC en APC eficientes que activan la activación de células T (Banchereau y Steinman, 1998) (Van Kooten C. y Banchereau, 2000).

Estudios recientes en modelos de ratón mostraron que la señalización de CD40 en células dendríticas también juega un papel importante en la generación de células TH17 que se consideran mediadores de la autoinmunidad en enfermedades tales como la artritis y la esclerosis múltiple (Iezzi, et al., 2009) (Perona-Wright, et al., 2009).

40 La disponibilidad de ratones con genes inactivados de CD40 y CD40L, como también los anticuerpos anti-ratón agonistas y antagonistas ofrecieron la posibilidad de estudiar la función de las interacciones CD40-CD40L en varios modelos de enfermedad. Se ha demostrado que la administración de bloqueo anti-CD40L es beneficiosa en varios modelos de autoinmunidad que incluyen enfermedades espontáneas como la nefritis lúpica en ratones SNF1 o diabetes en ratones NOD o en formas de enfermedad inducida experimentalmente como la artritis inducida por colágeno (CIA) o la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) (Toubi y Shoenfeld, 2004). CIA en ratones fue
45 inhibida por un mAb anti-CD40L que bloqueó el desarrollo de la inflamación articular, títulos de anticuerpos en suero para colágeno, la infiltración de células inflamatorias en el tejido subsinovial además de la erosión de cartílago y hueso (Durie, et al., 1993). Tanto para la nefritis lúpica como para la EAE, se demostró que el anti-CD40L también podría aliviar la enfermedad en curso, confirmando el papel de CD40-CD40L en la fase efectora de la enfermedad (Kalled, et al., 1998); (Howard, et al., 1999).

50 La función para las interacciones CD40-CD40L en el desarrollo de EAE también se estudió en ratones deficientes de CD40L que portaban un receptor de células T transgénico específico para la proteína básica mielina. Estos ratones no pudieron desarrollar EAE después del cebado con antígeno, y las células T CD4 + permanecieron inactivas y no produjeron INF- γ (Grewal, et al., 1996).

55 Asimismo, los anticuerpos inhibidores dirigidos contra CD40 demostraron efectos beneficiosos en modelos de enfermedad inflamatoria, como EAE. Lamann y sus colegas demostraron que el mAb CD40 antihumano de ratón antagonista mu5D12 y una versión quimérica de este mAb impedían eficazmente la expresión clínica de EAE

desmielinizante crónica en monos tífi comunes exogámicos (Laman, et al., 2002); (Boon, et al., 2001). Un estudio de seguimiento mostró que el tratamiento terapéutico con el anticuerpo CD40 anti-humano quimérico reduce la inflamación detectable por MRI y retrasa el agrandamiento de lesiones cerebrales preexistentes en el modelo de EAE de tífi (Hart, et al., 2005).

5 Se ensayaron anticuerpos anti-CD40 con actividad agonista en modelos de ratón de artritis con algunos resultados conflictivos. Tal como se esperaba para un agente inmunoestimulador, se demostró que el mAb FGK45 de CD40 agonístico anti-ratón exacerbaba la enfermedad en el modelo DBA/1 de CIA en ratones (Tellander, et al., 2000). Sin embargo, en otro modelo CIA crónico FGK45, y otro mAb CD40 agonístico anti-ratón, 3/23, ambos exhibieron efectos terapéuticos positivos (Mauri, et al., 2000). Este grupo postuló que los anticuerpos agonísticos en este régimen de tratamiento terapéutico tienen un efecto beneficioso al inducir la desviación inmunitaria hacia una respuesta Th2 con niveles disminuidos de IFN- γ y mayores niveles de IL-4 e IL-10 (Mauri, et al., 2000).

10 La prevención del rechazo al trasplante mediante el bloqueo de interacciones CD40/CD154 también se ha documentado. El uso de ch5D12, un antagonista anti-CD40 quimérico, en estudios de aloinjertos renales en monos rhesus, indica que el antagonismo de CD40 es suficiente para la modificación de la enfermedad y la prolongación de la supervivencia media pasados los 100 días. Cuando se combinó ch5D12 con un anticuerpo anti-CD86 y se administró solo al inicio de los estudios con aloinjerto seguido de un tratamiento prolongado con ciclosporina, se lograron tiempos de supervivencia medios superiores a 4 años, lo que indica que esta combinación puede inducir tolerancia (Haanstra, et al., 2005).

15 Por lo tanto, existen extensos estudios clínicos que aportan pruebas de la función crucial de la díada CD40-CD40L en conducir una eficiente respuesta inmunitaria dependiente de células T. El bloqueo de la señalización de CD40 se reconoce, por lo tanto, como una estrategia terapéutica adecuada y necesaria para suprimir una respuesta autoinmunitaria patogénica en enfermedades tales como RA, esclerosis múltiple o psoriasis. No obstante, hasta la fecha, no existen anticuerpos CD40 que hayan sido aprobados para intervención terapéutica de dichos trastornos debido a los hallazgos que demostraron previamente que los anticuerpos anti-CD40 generaban efectos colaterales importantes. Un anticuerpo anti-CD40, denominado 4D11, se ha descrito en el documento US 2004/0120948. Sin embargo, se ha recogido que este anticuerpo tiene una semivida corta (Aoyagi, et al., 2009, American Journal of Transplantation, 9(8): 1732-1741). Por consiguiente, existe una importante necesidad de agentes terapéuticos que puedan usarse para intervenir en la acción de CD40-CD40L y bloquear la señalización de CD40. Esta necesidad podría cubrirse con los nuevos anticuerpos anti-CD40 humanizados que se unen específicamente a CD40 y que muestran las propiedades de especificidad de unión al antígeno, afinidad, farmacocinética y farmacodinámica que permiten su uso en la intervención terapéutica de trastornos basados en CD40.

Breve resumen de la invención

20 La invención se presenta en el conjunto de reivindicaciones adjunto. Las realizaciones y/o ejemplos de la siguiente descripción que no están cubiertos por las reivindicaciones adjuntas no se consideran parte de la invención. La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal humanizado en el que dicho anticuerpo se une específicamente a CD40 humano que tiene una actividad antagonista IC50 de menos de 1 nM y no tiene agonismo hasta 100 μ g/ml en la proliferación de células B y en el que dicho anticuerpo se caracteriza adicionalmente porque el anticuerpo tiene una semivida in vivo en primates no humanos que es de al menos 10 días.

25 El anticuerpo monoclonal humanizado puede además caracterizarse porque el anticuerpo posee una semivida en monos cynomolgus de más de 8 días con una dosis inferior a 30 mg/kg.

30 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD40 humanizado que tiene una cadena pesada variable y una cadena ligera variable que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 52, respectivamente, donde el anticuerpo comprende una región Fc de inmunoglobulina humana y donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG1.

35 En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD40 humanizado que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de cualquiera de las SEQ ID N°: 32, SEQ ID N°: 33 o SEQ ID N°: 35.

40 En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD40 humanizado que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 31.

45 En este documento se describe un anticuerpo monoclonal caracterizado por que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la secuencia CDR1 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9 a SEQ ID NO: 11, una secuencia CDR2 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12 a SEQ ID NO: 15 y una secuencia CDR3 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO: 17; y donde la secuencia CDR1 de la cadena ligera tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 18 a SEQ ID NO: 21, una secuencia CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO: 22 a SEQ ID NO: 23 y una secuencia CDR3 de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 24 a SEQ ID NO: 25.

5 También se describe en este documento un anticuerpo monoclonal caracterizado por que comprende una secuencia CDR1 de cadena pesada de SEQ ID NO: 10, una secuencia CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO: 13 y una secuencia CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 16; y donde dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR1 de cadena ligera de SEQ ID NO: 19, una secuencia CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO: 22 y una secuencia CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 24.

10 También se describe en este documento un anticuerpo monoclonal que se describe en este documento caracterizado por que comprende una secuencia CDR1 de cadena pesada de SEQ ID NO: 9, una secuencia CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO: 14 y una secuencia CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 16 ; y en donde dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR1 de cadena ligera de SEQ ID NO: 20, una secuencia CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO: 22 y una secuencia CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 24.

15 También se describe en este documento un anticuerpo monoclonal que se describe en este documento caracterizado por que comprende una secuencia CDR1 de cadena pesada de SEQ ID NO: 9, una secuencia CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO: 14 y una secuencia CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 16 ; y donde dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR1 de cadena ligera de SEQ ID NO: 20, una secuencia CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO: 22 y una secuencia CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 24.

20 También se describe en este documento un anticuerpo monoclonal que se describe en este documento caracterizado por que comprende una secuencia CDR1 de cadena pesada de SEQ ID NO: 11, una secuencia CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO: 15 y una secuencia CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 17 ; y donde dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR1 de cadena ligera de SEQ ID NO: 21, una secuencia CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO: 23 y una secuencia CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 25.

También se describen en este documento secuencias individuales para cadenas pesadas de los anticuerpos preferidos de la invención.

25 La presente invención se refiere a un anticuerpo humanizado que tiene un dominio variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 31, respectivamente; SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 31, respectivamente; o SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 31, respectivamente.

En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado que tiene un dominio variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 31, respectivamente.

30 En otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado que tiene un dominio variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 31, respectivamente.

35 En otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 31, respectivamente.

40 También se describe en este documento un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a CD40 humano, que comprende un dominio variable de cadena pesada humanizado que comprende una región flanqueante que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de la región flanqueante de la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de dominio variable humano de SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 30, y que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera idéntica al menos 90% a un dominio variable de cadena ligera correspondiente de SEQ ID NO: 26.

45 Otra realización se refiere a un anticuerpo aislado que se une específicamente a CD40 humano, que comprende un dominio variable de cadena pesada humanizado que comprende una región flanqueante que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de la región flanqueante de la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de dominio variable humano de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 35, y que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera idéntica al menos 90% a una variable de cadena ligera correspondiente de SEQ ID NO: 31.

50 En otro aspecto, la invención se refiere al anticuerpo aislado descrito en la realización inmediatamente anterior, donde la secuencia de aminoácidos de cadena pesada es la SEQ ID NO: 32; en otra realización, la secuencia de aminoácidos de cadena pesada es SEQ ID NO: 33; y en otra realización, la secuencia de aminoácidos de cadena pesada es SEQ ID NO: 35.

55 También se describe en este documento un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a CD40 humano, que comprende un dominio variable de cadena pesada humanizado que comprende una región flanqueante que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de la región flanqueante de la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de dominio variable

humana de SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 40, y que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera al menos 90% idéntica a una cadena ligera correspondiente de SEQ ID NO: 36.

Los anticuerpos de la presente invención pueden además caracterizarse porque dichos anticuerpos no pueden estimular la producción de citocinas de células B en ausencia de CD40L.

- 5 Los anticuerpos de la presente invención pueden además caracterizarse porque dichos anticuerpos se unen a CD40 humana en presencia de 50% de suero humano con una reducción de la constante de afinidad de menos del doble.

Los anticuerpos de la presente invención pueden además caracterizarse porque dicho anticuerpo produce la inhibición de la producción de IgM e IgG en un mamífero a una concentración de 1 mg/kg.

- 10 Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse en diversos usos terapéuticos, profilácticos, de diagnóstico y otros métodos. Por ejemplo, la presente invención describe un uso para bloquear la función de CD40 humana en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una composición que comprende un anticuerpo de la invención en una cantidad suficiente para bloquear una respuesta inmune mediada por CD40 en dicho mamífero.

- 15 En un aspecto, el anticuerpo de la invención se usa para tratar o mejorar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En una realización, la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en injerto contra enfermedad del huésped, enfermedad autoinmune o inflamatoria, y cáncer que expresa CD40. También se contempla en este documento el anticuerpo según la invención para su uso en el tratamiento o mejora de la enfermedad de injerto contra huésped en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una composición que comprende un anticuerpo de la invención en una cantidad suficiente para disminuir uno o más de los síntomas de la enfermedad de injerto contra huésped en dicho animal.

- 20 A modo de ejemplo, la enfermedad autoinmune o inflamatoria puede incluir, pero no se limita a, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, glomerulonefritis proliferativa por lupus, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), psoriasis, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), enfermedad de Crohn y lupus sistémico eritematoso (LES), tiroiditis de Hashimoto, mixedema primario, tirotoxicosis/enfermedad de Graves, anemia perniciosa, gastritis atrófica autoinmune, carditis autoinmune, enfermedad de Addison, menopausia prematura, diabetes mellitus tipo 1, síndrome de Goodpasture, miastenia gravis, anemia hemolítica autoinmune, leucopenia idiopática, cirrosis biliar primaria, hepatitis crónica activa (HBs Ag negativo), cirrosis criptogénica, síndrome de Sjogren, dermatomiositis, esclerodermia, enfermedad mixta de los tejidos mixtos, lupus eritematoso discoide y vasculitis sistémica. En realizaciones ilustrativas, el mamífero padece artritis reumatoide.

- 30 El anticuerpo para usar según la invención puede comprender además un segundo agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un antagonista de TNF, un fármaco antirreumático modificador de enfermedad, un antagonista de CTLA4, un mAb de receptor anti-IL-6 y un mAb anti-CD20.

En realizaciones específicas, la enfermedad inflamatoria o la enfermedad autoinmunitaria es una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan tanto CD40 como CD20.

- 35 En realizaciones específicas, la composición de anticuerpo es para ser administrada por vía de administración parenteral.

En realizaciones específicas, composición de anticuerpo es para ser administrada por vía intravenosa o subcutánea.

Los usos adicionales de la invención comprenden inhibir la producción de anticuerpos por células B en un paciente humano que comprende administrar a dicho paciente humano una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD40 de la invención.

- 40 Más específicamente, el paciente humano tiene una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40.

- 45 En realizaciones ejemplares, el paciente humano padece una enfermedad autoinmune seleccionada del grupo que consiste en enfermedad autoinmune o inflamatoria seleccionada del grupo que consiste en artritis reumatoide, esclerosis múltiple, glomerulonefritis proliferativa de lupus, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), psoriasis, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), enfermedad de Crohn y lupus eritematoso sistémico (LES), tiroiditis de Hashimoto, mixoedema primario, tirotoxicosis/enfermedad de Graves, anemia perniciosa, gastritis atrófica autoinmune, carditis autoinmune, enfermedad de Addison, menopausia prematura, diabetes mellitus tipo 1, síndrome de Goodpasture, miastenia gravis, anemia hemolítica autoinmune, leucopenia idiopática, cirrosis biliar primaria, hepatitis crónica activa (HBs Ag negativo), cirrosis criptogénica, síndrome de Sjogren, dermatomiositis, esclerodermia, enfermedad mixta de los tejidos mixtos, lupus eritematoso discoide y vasculitis sistémica.

- 50 Otra realización de la invención se refiere a inhibir el crecimiento de células que expresan antígeno CD40 humano, que comprende administrar el anticuerpo de la invención a las células, anticuerpo que se une específicamente al antígeno CD40 de la superficie celular humana, en donde la unión del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno al antígeno CD40 inhibe el crecimiento o la diferenciación de las células.

- 5 También se contempla el anticuerpo de la invención para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno asociado a CD40, que comprende administrar al sujeto el anticuerpo de la invención, anticuerpo que se une a CD40 humano, en donde la unión del anticuerpo a CD40 inhibe el crecimiento o la diferenciación de las células del trastorno asociado a CD40. Las células pueden, pero sin limitarse a ello, ser células B linfoblastoides, pancreáticas, células de pulmón, células mamarias, células ováricas, células de colon, células de próstata, células de piel, células de cabeza y cuello, células de vejiga, células óseas o células renales.
- El anticuerpo para uso en la inhibición del crecimiento o diferenciación de células puede ser útil en el tratamiento de leucemia linfocítica crónica, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, linfoma de células T, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, macroglobulinemia de Waldenstrom o sarcoma de Kaposi.
- 10 También se contempla el anticuerpo de la invención para usar en la inducción del agotamiento de células B periféricas, que comprende administrar a las células el anticuerpo de la invención, anticuerpo que se une específicamente a un antígeno CD40 de la superficie de la célula humana, en donde la unión del anticuerpo al antígeno CD40 induce el agotamiento de las células.
- 15 En realizaciones específicas, el anticuerpo se administra a un sujeto que padece un trastorno inmunitario. Por ejemplo, el trastorno inmunitario es artritis reumatoide o lupus eritematoso sistémico.
- También se contempla el anticuerpo de la invención para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide en un sujeto, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo antagonista que bloquea la función de CD40 en dicho sujeto.
- Preferiblemente, el anticuerpo es para administrarse en una cantidad eficaz para inhibir la diferenciación de células B y un cambio de isotipo de anticuerpo en dicho sujeto.
- 20 En otras realizaciones, el anticuerpo es para administrarse en una cantidad eficaz para inhibir la producción de citocinas y quimiocinas y el aumento de moléculas de adhesión en células T y macrófagos en dicho sujeto. Preferiblemente, el anticuerpo se administra en una cantidad eficaz para inhibir la activación de células dendríticas en dicho sujeto.
- 25 En otras realizaciones, el anticuerpo se usa en una cantidad eficaz para inhibir la producción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, metaloproteinasas de matriz, prostaglandinas y moléculas de adhesión reguladas negativamente en células no inmunes en dicho sujeto.
- En realizaciones específicas, el anticuerpo se administra en combinación con un régimen que comprende la administración de metotrexato y/o la administración de Enbrel/Humira.
- El sujeto que recibe la terapia padece artritis reumatoide y ha sido sensible al tratamiento con metotrexato solo.
- 30 En realizaciones específicas, el uso comprende tratar a dicho sujeto con un régimen que comprende la administración de metotrexato y/o administración de Enbrel/Humira.
- El anticuerpo para uso de la invención se puede caracterizar adicionalmente en donde el tratamiento de dicho sujeto con dicho anticuerpo antagonista anti-CD40 tiene una eficacia superior al tratamiento con metotrexato solo, Enbrel solo, una combinación de Enbrel + metotrexato.
- 35 El anticuerpo para uso de la invención se puede caracterizar adicionalmente en donde el tratamiento de dicho sujeto con dicho anticuerpo antagonista anti-CD40 tiene una eficacia superior al tratamiento con Enbrel + MTX en pacientes que han tenido una respuesta inadecuada a metotrexato.
- En realizaciones específicas, el anticuerpo se administra en combinación con un régimen que comprende un agente anti-TNF.
- 40 En realizaciones específicas, el sujeto se caracteriza porque padece artritis reumatoide y por una respuesta no sensible al tratamiento con agente anti-TNF solo. En tales realizaciones, el uso puede comprender tratar a dicho sujeto con un régimen que comprende el tratamiento con un agente anti-TNF en combinación con dicho anticuerpo anti-CD40 antagonista.
- 45 En realizaciones específicas, el tratamiento de dicho sujeto con dicho anticuerpo anti-CD40 antagonista posee una eficacia superior al tratamiento con un agente anti-TNF.
- En aún otras realizaciones, el uso se caracteriza porque el tratamiento de dicho sujeto con dicho anticuerpo antagonista anti-CD40 tiene una eficacia superior al tratamiento con Orencia o Rituxan en pacientes que han tenido una respuesta inadecuada a un agente anti-TNF solo.
- 50 La presente invención además contempla una composición farmacéutica que comprende: (i) el anticuerpo anti-CD40 humanizado como se describe en este documento; y (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable. En tales composiciones, el anticuerpo puede conjugarse ventajosamente con un segundo agente, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, un PEG-vehículo, una enzima o un marcador.

También se contempla en este documento un polinucleótido aislado o polinucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:58, y que codifica una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:52, donde el anticuerpo comprende una región Fc de inmunoglobulina humana y donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG1.

- 5 La invención también se refiere al uso de los anticuerpos descritos en este documento para la elaboración de un medicamento para bloquear la función de la CD40 humana en un mamífero, donde el medicamento bloquea una respuesta inmunitaria mediada por CD40 en dicho mamífero.

En una realización, la invención se refiere a la elaboración de un medicamento para tratar o aliviar la enfermedad injerto contra hospedante en un mamífero.

- 10 En realizaciones ejemplares, el medicamento se fabrica para el tratamiento de una enfermedad autoinmune o inflamatoria seleccionada del grupo que consiste en artritis reumatoide, esclerosis múltiple, glomerulonefritis proliferativa por lupus, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), psoriasis, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), enfermedad de Crohn y lupus eritematoso sistémico (LES), tiroiditis de Hashimoto, mixoedema primario, tirotoxicosis/enfermedad de Graves, anemia perniciosa, gastritis atrófica autoinmune, carditis autoinmune, enfermedad de Addison, menopausia prematura, diabetes mellitus tipo 1, síndrome de Goodpasture, miastenia gravis, anemia hemolítica autoinmune, leucopenia idiopática, cirrosis biliar primaria, hepatitis crónica activa (HBs Ag negativo), cirrosis criptogénica, síndrome de Sjogren, dermatomiositis, esclerodermia, enfermedad mixta de los tejidos mixtos, lupus eritematoso discoide y vasculitis sistémica.

- 15 En algunas realizaciones, el medicamento puede además comprender la administración de un segundo agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un antagonista de TNF, un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad, un antagonista de CTLA4, un receptor anti-IL-6 mAb y un anti-CD20 mAb.

El medicamento puede elaborarse para uso en una ruta de administración parenteral. El medicamento puede elaborarse para uso intravenoso o subcutáneo.

- 20 Otra realización contempla un uso de los anticuerpos descritos en este documento para la elaboración de un medicamento para la inhibición de la producción de anticuerpos por parte de las células B en un paciente humano.

Otra realización contempla un uso de los anticuerpos descritos en este documento para la elaboración de un medicamento para la inhibición de la proliferación y/o diferenciación de células que expresan el antígeno CD40 humano.

- 25 Otra realización contempla el uso de los anticuerpos descritos en este documento para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno asociado a CD40 en el que la unión del anticuerpo en dicho medicamento a CD40 inhibe el crecimiento o la diferenciación de células del trastorno asociado a CD40.

- 30 El medicamento puede elaborarse para uso en el tratamiento de las células, en un trastorno asociado a CD40, seleccionadas entre células B linfoblastoides, pancreáticas, células de pulmón, células mamarias, células ováricas, células de colon, células de próstata, células de piel, células de cabeza y cuello, células de vejiga, células óseas o células renales.

El medicamento puede elaborarse para uso en el tratamiento de leucemia linfocítica crónica, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, linfoma de células T, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, macroglobulinemia de Waldenstrom o sarcoma de Kaposi.

- 35 Otra realización contempla el uso de anticuerpos de la invención en la fabricación de un medicamento para inducir el agotamiento de células B periféricas en donde el anticuerpo del medicamento se une específicamente a un antígeno CD40 de la superficie de la célula humana, en donde la unión del anticuerpo al antígeno CD40 induce el agotamiento de las células.

El medicamento puede elaborarse para uso en el tratamiento de un sujeto que padece un trastorno autoinmunitario.

- 40 El medicamento puede elaborarse para uso en el tratamiento de artritis reumatoide o lupus eritematoso sistémico.

Otra realización contempla el uso de los anticuerpos de la invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de artritis reumatoide en un sujeto.

El medicamento puede elaborarse para uso en la inhibición de la diferenciación de células B y cambios de isotipo del anticuerpo en dicho sujeto.

- 45 El medicamento puede elaborarse para uso en la inhibición de la producción de citocinas y quimiocinas y el aumento de moléculas de adhesión en células T y macrófagos en dicho sujeto.

El medicamento puede elaborarse para uso en la inhibición de la activación de células dendríticas en dicho sujeto.

El medicamento puede elaborarse para uso en la inhibición de la producción de citocinas inflamatorias, quimiocinas, metaloproteinasas de matriz, prostaglandinas, y en la reducción de moléculas de adhesión en células no inmunitarias en dicho sujeto.

5 En ciertas realizaciones, el medicamento se elabora como un medicamento combinado para administrar en combinación con un régimen que comprende la administración de metotrexato y/o la administración de Enbrel/Humira.

En otras realizaciones, el medicamento se elabora como un medicamento combinado, y el medicamento, además de comprender los anticuerpos de la invención, comprende también un agente anti-TNF.

Breve descripción de varias vistas de los dibujos

10 Figura 1: A. Curvas de unión y valores CE50 correspondientes de anticuerpos humanizados en células HEK-293 transfectadas con CD40 medidas por citometría de flujo. B. Comparación de unión de Anticuerpo A, Anticuerpo B y Anticuerpo C a células transfectadas con CD40 medida por citometría de flujo. Se muestran los datos representativos de un experimento

15 Figura 2: Curvas de unión y valores CE50 correspondientes de anticuerpos humanizados en células RAMOS medidas por citometría de flujo. Se muestran los datos representativos de un experimento.

Figura 3: Pruebas de anticuerpos de ratón y humanizados para la actividad antagonista en ensayos de proliferación de células B primarias humanas. (A) Se representan las curvas de titulación de anticuerpos representativos y valores CI50 resultantes para cada anticuerpo precursor de ratón. Se muestran los datos representativos de un donante. (B) Superposición de las curvas de inhibición que representan el antagonismo de diversos anticuerpos anti-CD40 humanizados en comparación con 4D11.

20

Figura 4: Resumen de los resultados de las pruebas de anticuerpos humanizados para actividad antagonista (CI50) y agonista (SI= índice de estimulación) en un ensayo de proliferación de células B primarias humanas. Se exhiben diversos anticuerpos anti-CD40, 4D11, G28.5 y 5D12, para comparación.

25 Figura 5: Pruebas del Anticuerpo B, Anticuerpo A y Anticuerpo C para inhibición de aumento de CD86 inducido por CD40 en ensayos de sangre completa humana. Se muestra el anticuerpo 4D11 anti-CD40 para comparación. El control del isotipo IgG1 no demostró efectos en este ensayo. Se muestran los datos representativos de un donante.

Figura 6: Resumen de los resultados de las pruebas del Anticuerpo B para inhibición del aumento de CD86 inducido por CD40 en células B purificadas humanas y sangre completa humana. Se representan los datos en ambos puntos (A) CI50 y (B) CI90. El control del isotipo IgG1 no demostró efectos en ninguno de estos ensayos. En la tabla se resumen los datos de múltiples donantes (n=4-5).

30

Figura 7: Pruebas del Anticuerpo B, Anticuerpo A y Anticuerpo C para inhibición de aumento de CD86 inducido por CD40 en ensayos de sangre completa humana de mono cynomolgus. El control del isotipo IgG1 no mostró efectos en este ensayo. Se muestran los datos representativos de un donante.

35 Figura 8: Curvas de tiempo de concentración en plasma para el Anticuerpo A (panel izquierdo) y el Anticuerpo B (panel derecho) en mono cynomolgus tras la administración de 1 y 10 mg/kg de cada anticuerpo. Los datos equivalen al resumen de la administración a 3 animales de cada anticuerpo.

Figura 9: Cambio de porcentaje de células B CD86-positivas de monos cynomolgus antes de la administración de (Anticuerpo B) y (Anticuerpo A) y en 3 puntos de tiempo después del tratamiento con cada anticuerpo. Se administraron el Anticuerpo B (paneles superiores) y el Anticuerpo A a 3 animales cada uno con 1 mg/kg (paneles izquierdos) o 10 mg/kg (paneles derechos).

40

Figura 10: (A) Niveles de IgG humana y (B) IgM humana en ratones NSG 2 semanas después de la inyección de $1,25 \times 10^6$ PBMC humano. Los ratones se trataron con vehículo, un control de isotipo y anticuerpos Anticuerpo A, Anticuerpo B y Anticuerpo C en una dosis de 1 mg/kg un día antes de la transferencia de PBMC humano

Figura 11: Unión de los distintos anticuerpos CD40 antihumano de ratón a plaquetas humanas.

45 Figura 12: Resumen de los resultados de la comparación de la unión de Anticuerpo B a anti-CD40 mAb 4D11 en células B humanas y plaquetas en sangre completa

Figura 13: Actividad ADCC con constructos de IgG1 con genes inactivados y de tipo salvaje

Descripción detallada de la invención

50 La señalización mediada por CD40 se reconoce ahora como implicada en una diversidad de trastornos diana. A pesar de la disponibilidad de una diversidad de datos clínicos que muestran que la intervención en estos trastornos sería terapéuticamente beneficiosa, aún existe la necesidad de anticuerpos anti-CD40 antagonistas que puedan

usarse en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. La presente invención se refiere a anticuerpos humanizados que reconocen CD40. Se ha identificado la secuencia de estos anticuerpos humanizados basándose en las secuencias de ciertos anticuerpos de ratón iniciales.

5 Las expresiones "CD40" y "antígeno de superficie CD40" se refieren a una glucoproteína de aproximadamente 48 kD expresada en la superficie de células B normales y neoplásicas, que actúa como un receptor de señales implicadas en la proliferación y diferenciación celular (Ledbetter et al., 1987, J. Immunol. 138:788-785). Una molécula de cDNA que codifica CD40 ha sido aislada de una genoteca preparada a partir de la línea celular de linfoma de Burkitt Raji (Stamenkovic et al., 1989, EMBO J. 8:1403).

10 Como se usa en este documento, una célula que expresa de manera endógena CD40 es cualquier célula caracterizada por la expresión superficial de CD40, incluyendo, aunque sin limitarse a ello, células B normales y neoplásicas, células interdigitantes, células epiteliales basales, células de carcinoma, macrófagos, células endoteliales, células dendríticas foliculares, células de amígdalas y células plasmáticas derivadas de médula ósea. En algunas realizaciones, la molécula de CD40 es una molécula de CD40 humana.

15 Los anticuerpos de la invención se unen específicamente a CD40 recombinante humana y nativa. Un anticuerpo monoclonal humanizado en el que dicho anticuerpo se une específicamente a CD40 humano que tiene una actividad antagonista IC50 de menos de 1 nM y no tiene agonismo hasta 100 µg/ml en la proliferación de células B y en el que dicho anticuerpo se caracteriza adicionalmente porque el anticuerpo tiene una semivida in vivo en primates no humanos que es de al menos 10 días.

20 Preferiblemente, el anticuerpo se une específicamente a CD40 en el conjugado CD40-Fc con un valor CE50 inferior a 1 nM y CD40 en células que expresan CD40 con un valor CE50 inferior a 2,5 nM. Las propiedades antagonistas del anticuerpo se definen porque poseen un valor CI50 de actividad agonista de células B o células dendríticas inferior a 1 nM. El anticuerpo posee también propiedades farmacocinéticas superiores que tienen mayor semivida in vivo que otros anticuerpos anti-CD40 (p. ej., el anticuerpo anti-CD40 4D11).

25 Como se usa en este documento, una célula que expresa CD40 es cualquier célula caracterizada por la expresión superficial de CD40, incluyendo, aunque sin limitarse a ello, células B normales y neoplásicas, células interdigitantes, células epiteliales basales, células de carcinoma, macrófagos, células endoteliales, células dendríticas foliculares, células de amígdalas y células plasmáticas derivadas de médula ósea. En algunas realizaciones, la molécula de CD40 es una molécula de CD40 humana.

30 Los anticuerpos de la presente invención reconocen el "epítipo de antígeno CD40" y el "epítipo CD40" específico. Como se emplean en este documento, los términos se refieren a una molécula (p. ej., un péptido) o un fragmento de una molécula capaz de inmunorreactividad con un anticuerpo anti-CD40 y, por ejemplo, incluyen un determinante antigénico de CD40 reconocido por cualquiera de los anticuerpos que tienen una combinación de secuencia de cadena pesada/cadena ligera de la SEQ ID NO.26 de cadena ligera con cualquiera de las SEQ ID de cadena ligera NO: 27, 28, 29 o 30; o SEQ ID de cadena ligera NO: 31 con cualquiera de las SEQ ID de cadena pesada NO 32, 33, 34 o 35; o SEQ ID de cadena ligera NO 36 con cualquiera de las SEQ ID de cadena pesada NO 37, 38, 39 o 40. Los epítopos de antígeno CD40 pueden incluirse en proteínas, fragmentos de proteínas, péptidos o similares. Los epítopos son más comúnmente proteínas, oligopéptidos cortos, miméticos de oligopéptidos (es decir, compuestos orgánicos que imitan las propiedades de unión a anticuerpos del antígeno CD40), o sus combinaciones.

40 Los expertos en la técnica conocen la estructura generalizada de los anticuerpos o la inmunoglobulina, estas moléculas son glucoproteínas heterotetrámicas, típicamente de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas (H). Cada cadena ligera está covalentemente unida a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro para formar un heterodímero, y la molécula heterotramérica se forma mediante una unión disulfuro covalente entre las dos cadenas pesadas idénticas de los heterodímeros. Aunque las cadenas ligeras y pesadas están unidas entre sí por un enlace disulfuro, el número de uniones disulfuro entre las dos cadenas pesadas varía por el isotipo de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también posee puentes disulfuro intracadena espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en el término amino un dominio variable (V_H), seguido de tres o cuatro dominios constantes (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} y C_{H4}), como también una región bisagra entre C_{H1} y C_{H2}. Cada cadena ligera tiene dos dominios, un dominio variable aminoterminal (V_L) y un dominio constante carboxiterminal (C_L). El dominio V_L se asocia no covalentemente con el dominio V_H, mientras que el dominio C_L está unido covalentemente al dominio C_{H1} mediante un enlace disulfuro. Se cree que los residuos aminoácidos particulares forman una interconexión entre los dominios variables de cadena ligera y pesada (Chothia et al., 1985, J. Mol. Biol. 186:651-663).

55 Ciertos dominios dentro de los dominios variables difieren en gran medida entre los diferentes anticuerpos, es decir, son "hipervariables". Estos dominios hipervariables contienen residuos que están directamente implicados en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su determinante antigénico específico. La hipervariabilidad, tanto en los dominios variables de cadena ligera como de cadena pesada, se concentra en tres segmentos conocidos como regiones determinantes complementarias (CDR) o bucles hipervariables (HVL). Las CDR se definen por la comparación de secuencias en Kabat et al., 1991, en: Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., mientras que los HVL se definen

estructuralmente de acuerdo con la estructura tridimensional del dominio variable, como se describe en Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917. Si bien estos dos métodos resultan en identificaciones levemente diferentes de una CDR, se prefiere la definición estructural. Como lo define Kabat, la CDR-L1 está posicionada aproximadamente en los residuos 24-34, la CDR-L2, aproximadamente en los residuos 50-56 y la CDR-L3 aproximadamente en los residuos 89-97 en el dominio variable de cadena ligera; La CDR-H1 está posicionada aproximadamente en los residuos 31-35, la CDR-H2, aproximadamente en los residuos 50-65 y la CDR-H3, aproximadamente en los residuos 95-102 en el dominio variable de cadena pesada; Las CDR1, CDR2, CDR3 de las cadenas ligeras y pesadas definen, por lo tanto, las propiedades únicas y funcionales específicas de un anticuerpo determinado.

Las tres CDR dentro de cada una de las cadenas pesadas y ligeras se separan mediante regiones flanqueantes (FR), que contienen secuencias que tienden a ser menos variables. Desde el término amino al término carboxi de los dominios variables de cadena pesada y liviana, las FR y CDR se disponen en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La configuración en gran parte de hojas β de los FR trae los CDR dentro de cada una de las cadenas muy cerca el uno del otro, así como a los CDR de la otra cadena. La conformación resultante contribuye al sitio de unión al antígeno (véase Kabat et al., 1991, NIH Publ. No. 91-3242, Vol. I, páginas 647-669), aunque no todos los residuos de CDR están necesariamente directamente implicados en la unión al antígeno.

Los residuos de FR y los dominios constantes de Ig no están directamente implicados en la unión a antígenos, pero contribuyen a la unión al antígeno y/o median la función efectora del anticuerpo. Se cree que algunos residuos de FR tienen un efecto significativo en la unión al antígeno en por lo menos tres formas: uniendo no covalentemente a un epítipo, interactuando con uno o más residuos de CDR y afectando la interconexión entre las cadenas pesadas y ligeras. Los dominios constantes no están directamente implicados en la unión al antígeno pero median diversas funciones efectoras de Ig, como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), citotoxicidad dependiente de complementos (CDC) y fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP).

Las cadenas ligeras de inmunoglobulinas de vertebrados se asignan a una de dos clases claramente distintas, kappa (κ) y lambda (λ), en base a la secuencia de aminoácidos del dominio constante. En comparación, las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas de mamíferos se asignan a una de cinco clases principales, de acuerdo con la secuencia de los dominios constantes: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM. IgG e IgA también se dividen en subclases (isotipos), p. ej., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ y IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Se conocen las estructuras subunitarias y las configuraciones tridimensionales de las clases de inmunoglobulinas nativas.

Las expresiones "anticuerpo", "anticuerpo anti-CD40", "anticuerpo anti-CD40 humanizado" y "anticuerpo anti-CD40 humanizado variante" se usan en este documento en el sentido más amplio y abarcan específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud total), anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos tales como dominios variables y otras porciones de anticuerpos que exhiben una actividad biológica deseada, p. ej., unión CD40.

La expresión "anticuerpo monoclonal" (mAb) se refiere a un anticuerpo de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos; es decir, los anticuerpos individuales en esa población son idénticos, excepto por mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigidos contra un único determinante antigénico, un "epítipo". Por lo tanto, el modificador "monoclonal" es indicativo de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos dirigidos hacia el epítipo idéntico y no se interpretará que requiere producción del anticuerpo por ningún método particular. Se ha de entender que los anticuerpos monoclonales pueden realizarse mediante cualquier técnica o metodología conocida en la técnica; incluyendo, p. ej., el método de hibridoma (Kohler et al., 1975, Nature 256:495), o métodos de DNA recombinante conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 4,816,567), o métodos de aislamiento de producción monoclonal recombinante que utilizan genotecas de anticuerpos de fago, usando las técnicas descritas en Clackson et al., 1991, Nature 352: 624-628, y Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581-597.

Los anticuerpos quiméricos consisten en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo de una especie (p. ej., un mamífero no humano tal como un ratón) y los anticuerpos de las regiones constantes de cadena pesada y ligera de otras especies (p. ej., humana) y pueden obtenerse uniendo las secuencias de DNA que codifican las regiones variables del anticuerpo de la primera especie (p. ej., ratón) a las secuencias de DNA para las regiones constantes del anticuerpo de la segunda especie (p. ej., humana) y transformando un hospedante con un vector de expresión que contiene las secuencias unidas para permitirle producir un anticuerpo quimérico. Alternativamente, el anticuerpo quimérico también podría ser uno en el que una o más regiones o dominios de la cadena pesada y/o ligera sean idénticos con, homólogos a, o una variante de la correspondiente secuencia en un anticuerpo monoclonal de otra clase o isotipo de inmunoglobulina, o de una secuencia de líneas germinales o de consenso. Los anticuerpos quiméricos pueden incluir fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que el fragmento de anticuerpo exhiba la actividad biológica deseada de su anticuerpo madre, por ejemplo la unión al mismo epítipo (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense No. 4.816.567; y Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855).

Las expresiones "fragmento de anticuerpo", "fragmento de anticuerpo anti-CD40", "fragmento de anticuerpo anti-CD40 humanizado", "fragmento de anticuerpo anti-CD40 humanizado variante" se refieren a una porción de un anticuerpo anti-CD40 de longitud total, en el que se retiene una región variable o una capacidad funcional, por ejemplo unión al epítipo CD40 específico. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, aunque sin limitarse a ello, un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, scFv y scFv-Fc, un diacuerpo, un anticuerpo lineal, un anticuerpo monocatenario, un minicuerpo, un diacuerpo formado a partir de fragmentos de anticuerpo y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Los anticuerpos de longitud total pueden tratarse con enzimas tales como papaína o pepsina para generar fragmentos de anticuerpos útiles. La digestión con papaína se utiliza para producir dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, denominados fragmentos Fab, cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento Fc residual. El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el dominio C_{H1} de la cadena pesada. El tratamiento con pepsina da un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de unión al antígeno y es todavía capaz de reticular el antígeno.

Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la presencia de residuos adicionales que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo en el término C del dominio C_{H1}. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ son pares de fragmentos Fab' unidos por residuos cisteína en la región bisagra. Se conocen también otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

"El fragmento Fv" contiene un sitio de unión y reconocimiento de antígeno completo que consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha, no covalente. En esta configuración, las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. Colectivamente, las seis CDR confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo.

Un fragmento de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" es una variante Fv monocatenaria que comprende los dominios V_H y V_L de un anticuerpo donde los dominios están presentes en una cadena de polipéptidos simple. El Fv monocatenario es capaz de reconocer la unión al antígeno. El polipéptido scFv puede opcionalmente contener también un enlazador polipeptídico posicionado entre los dominios V_H y V_L con el fin de facilitar la formación de una estructura tridimensional deseada para la unión al antígeno mediante scFv (véase, p. ej., Pluckthun, 1994, en *The Pharmacology of monoclonal Antibodies*, Vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315).

Otros fragmentos de anticuerpo incluyen aquellos que comprenden un par de segmentos Fd tándem (V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}) para formar un par de regiones de unión al antígeno. Estos "anticuerpos lineales" pueden ser biespecíficos o mono-específicos como se describe, por ejemplo, en Zapata et al. 1995, *Protein Eng.* 8(10):1057-1062.

Un anticuerpo humanizado o un fragmento de anticuerpo humanizado es un tipo específico de anticuerpo quimérico que incluye una variante de la secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina, o su fragmento, capaz de unirse a un antígeno predeterminado y que comprende una o más FR que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una o más CDR que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana. Esta secuencia de aminoácidos no humana que a menudo se denomina secuencia "importada" típicamente se toma de un dominio de anticuerpo "importado", particularmente un dominio variable. En general, un anticuerpo humanizado incluye por lo menos las CDR o HVL de un anticuerpo no humano, insertado entre las FR de un dominio variable de cadena pesada o ligera humano. La presente invención describe anticuerpos anti-CD40 humanizados específicos que contienen las CDR derivadas de los anticuerpos monoclonales murinos que se muestran en las Tablas 3 y 4 insertados entre las FR de los dominios variables de cadena pesada y ligera de la secuencia de líneas germinales humanas. Se ha de entender que ciertos residuos FR murinos pueden ser importantes para la función de los anticuerpos humanizados y, en consecuencia, ciertos dominios variables de cadena pesada y ligera de la secuencia de líneas germinales humanas se modifican para ser los mismos que aquellos de la correspondiente secuencia murina.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-CD40 humanizado comprende sustancialmente todo de por lo menos uno, y típicamente dos, dominios variables (como el contenido, por ejemplo en los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc y Fv) en los que todas, o sustancialmente todas las CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana, y específicamente en este documento, todas las CDR son secuencias murinas según se detalla en las Tablas 1 a 4 de este documento, y todas, o sustancialmente todas las FR son aquellas de un consenso o secuencia de líneas germinales de inmunoglobulina humana. En otro aspecto, un anticuerpo anti-CD40 humanizado también incluye por lo menos una porción de una región Fc de inmunoglobulina, típicamente aquella de una inmunoglobulina humana. Comúnmente, el anticuerpo contendrá tanto la cadena ligera como por lo menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir una o más de las bisagras C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} y/o C_{H4} de la cadena pesada, según sea apropiado.

Un anticuerpo anti-CD40 humanizado puede seleccionarse de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA y IgE, y cualquier isotipo, incluyendo IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Por ejemplo, el dominio constante puede ser un dominio constante fijo de complemento donde se desea que el anticuerpo humanizado exhiba actividad citotóxica, y el isotipo sea típicamente IgG₁. Si no se desea dicha actividad citotóxica, el dominio

5 constante puede ser otro isotipo, p. ej., IgG₂. Un anticuerpo anti-CD40 humanizado alternativo puede comprender las secuencias de más de una clase o isotipo de inmunoglobulina, y seleccionar dominios constantes particulares para optimizar las funciones efectoras deseadas está dentro de la práctica ordinaria en la técnica. La presente invención provee anticuerpos que son anticuerpos IgG₁ y más particularmente anticuerpos IgG₁ en los que hay una inactivación de las funciones efectoras.

10 Las FR y CDR, o HVL, de un anticuerpo anti-CD40 humanizado no necesitan corresponderse precisamente con las secuencias parentales. Por ejemplo, uno o más residuos en la CDR importada, o HVL, o la secuencia FR de líneas germinales o consenso puede alterarse (p. ej., mutagenizarse) por sustitución, inserción o eliminación de modo tal que el residuo de aminoácidos resultante ya no sea idéntico al residuo original en la correspondiente posición en ninguna de las secuencias parentales, pero el anticuerpo, no obstante, retiene la función de unión a CD40. Dicha alteración típicamente no será extensa y será una alteración conservadora. Usualmente, por lo menos 75% de los residuos de anticuerpo humanizado se corresponderán con aquellos de la FR de líneas germinales o consenso parental y las secuencias CDR importadas, más a menudo por lo menos 90%, y los más frecuentemente más de 95%, o más de 98% o más de 99%.

15 Los residuos de inmunoglobulina que afectan la interconexión entre las regiones variables de cadena pesada y ligera ("la interface V_L-V_H") son aquellos que afectan la proximidad u orientación de las dos cadenas una respecto de la otra. Ciertos residuos que pueden estar implicados en las interacciones entre cadenas incluyen los residuos V_L 34, 36, 38, 44, 46, 87, 89, 91, 96, y 98 y los residuos V_H 35, 37, 39, 45, 47, 91, 93, 95, 100, y 103 (utilizando el sistema de numeración establecido en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987)). La Pat. de EE.UU. No. 6.407.213 también describe que los residuos tales como los residuos V_L 43 y 85, y los residuos V_H 43 y 60 también pueden estar implicados en esta interacción. Si bien estos residuos se indican para IgG humana solamente, son aplicables en otras especies. Se seleccionan residuos de anticuerpo importantes que se espera razonablemente que estén implicados en interacciones entre cadenas para sustitución en la secuencia de consenso.

20 25 Las expresiones "secuencia de consenso" y "anticuerpo de consenso" se refieren a una secuencia de aminoácidos que comprende el residuo de aminoácidos que ocurre con mayor frecuencia en cada ubicación en todas las inmunoglobulinas de cualquier clase particular, isotipo o estructura subunitaria, p. ej., un dominio variable de inmunoglobulina humana. La secuencia de consenso puede basarse en inmunoglobulinas de una especie particular o de muchas especies. Se entiende que una secuencia o estructura de "consenso", o anticuerpo abarca 30 una secuencia humana de consenso según se describe en ciertas realizaciones, y se refiere a una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos de aminoácidos que ocurren con mayor frecuencia en cada ubicación en todas las inmunoglobulinas humanas de cualquier clase, isotipo o estructura subunitaria particular. Por lo tanto, la secuencia de consenso contiene una secuencia de aminoácidos que tiene en cada posición un aminoácido que está presente en una o más inmunoglobulinas conocidas, pero que puede no duplicar exactamente toda la secuencia de aminoácidos de cualquier inmunoglobulina individual. La secuencia consenso de la región variable no se obtiene de ningún anticuerpo o inmunoglobulina producidos de forma natural. Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., y sus variantes. Las FR de secuencias de consenso de cadena pesada y ligera, y sus variantes, proveen secuencias útiles para la preparación de anticuerpos anti-CD40 humanizados. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses No. 40 6.037.454 y 6.054.297.

45 Las secuencias de líneas germinales humanas se hallan naturalmente en la población humana. Una combinación de esos genes de líneas germinales genera diversidad de anticuerpos. Las secuencias de anticuerpos de líneas germinales para la cadena ligera del anticuerpo vienen de genes v y genes j de kappa o lambda de líneas germinales humanas conservadas. De forma similar, las secuencias de cadena pesada provienen de los genes v, d y j de la línea germinal (LeFranc, M-P, y LeFranc, G, "The Immunoglobulin Facts Book" Academic Press, 2001).

50 Como se emplea en esta memoria, "variante", "variante anti-CD40", "variante anti-CD40 humanizada" o "anti-CD40 variante humanizada" se refieren a un anticuerpo anti-CD40 humanizado que tiene por lo menos una CDR murina variable de cadena pesada de cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 1 a 4 o una secuencia CDR murina de cadena ligera derivada del anticuerpo monoclonal murino que se muestra en cualquiera de las SEQ ID NO:5 a SEQ ID NO:8 y las secuencias FR derivadas de secuencias de consenso humano. Las variantes incluyen aquellas que tienen uno o más cambios de aminoácidos en uno o ambos dominios variables de cadena ligera o pesada, siempre que el cambio de aminoácido no obstaculice sustancialmente la unión del anticuerpo a CD40. Los anticuerpos humanizados ilustrativos producidos en este documento incluyen aquellos diseñados como Anticuerpo A, Anticuerpo B y Anticuerpo C, y las diversas secuencias de cadena pesada y ligera de los mismos se muestran en las SEQ ID NO 26 a SEQ ID NO:40.

60 Un anticuerpo "aislado" es aquel que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes del entorno natural del anticuerpo son aquellos materiales que pueden interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden ser enzimas, hormonas u otros solutos proteináceos o no proteináceos. En un aspecto, el anticuerpo se purificará hasta por lo menos más de 95% de aislamiento en peso del anticuerpo.

Un anticuerpo aislado incluye un anticuerpo in situ dentro de células recombinantes en las que se produce, ya que por lo menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Comúnmente, no obstante, un anticuerpo aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación en la que se elimina el material celular recombinante.

5 La expresión "desempeño del anticuerpo" se refiere a factores que contribuyen al reconocimiento del anticuerpo de antígenos o la eficacia de un anticuerpo in vivo. Los cambios en la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo pueden afectar las propiedades del anticuerpo tales como pliegue, y pueden influir en los factores físicos tales como índice inicial de unión del anticuerpo al antígeno (k_a), constante de disociación del anticuerpo del antígeno (k_d), constante de afinidad del anticuerpo hacia el antígeno (K_d), conformación del anticuerpo, estabilidad de proteína y semivida del anticuerpo.

10 La expresión "epítipo marcado" cuando se usa en esta memoria, se refiere a un anticuerpo anti-CD40 condensado a una "marca de epítipo". Una "marca de epítipo" es un polipéptido que tiene un número suficiente de aminoácidos como para proveer un epítipo para producción de anticuerpos; aún así tiene un diseño tal que no interfiere con la actividad deseada del anticuerpo anti-CD40 humanizado. La marca de epítipo por lo general es lo suficientemente única como para que un anticuerpo generado contra esa marca de epítipo no reaccione de manera sustancialmente cruzada con otros epítipos. Los polipéptidos marcados adecuados en general contienen por lo menos 6 residuos de aminoácidos y usualmente contienen aproximadamente 8 a 50 residuos de aminoácidos, o aproximadamente 9 a 30 residuos. Los ejemplos de marcas de epítipos y el anticuerpo que se une al epítipo incluyen el polipéptido de marca HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 (Field et al., 1988 Mol. Cell. Biol. 8: 2159-2165; la marca c-myc y sus anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 (Evan et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5(12):3610-3616; y la marca de la glucoproteína D del virus del herpes simple (gD) y su anticuerpo (Paborsky et al. 1990, Protein Engineering 3(6): 547-553). En ciertas realizaciones, la marca del epítipo es un "epítipo de unión al receptor de rescate". Como se usa en esta memoria, la expresión "epítipo de unión al receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (como IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable de aumentar la semivida en suero in vivo de la molécula de IgG.

15 En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención pueden conjugarse a un agente citotóxico. Esto es cualquier sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o que causa la destrucción de las células. La expresión tiene como fin incluir isótopos radiactivos (como ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re), agentes quimioterapéuticos y toxinas, tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, y sus fragmentos. Dichos agentes citotóxicos pueden acoplarse a los anticuerpos humanizados de la presente invención usando procedimientos convencionales, y usarse, por ejemplo, para tratar a un paciente indicado para terapia con el anticuerpo.

20 Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Existen numerosos ejemplos de agentes quimioterapéuticos que podrían conjugarse con los anticuerpos terapéuticos de la presente invención. Los ejemplos de dichos agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclosfosfamida; alquilsulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquone, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosfamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulacetina y bulatacinona); camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesin, carzelesin, y bizelesin); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina, auristatinas, (incluyendo análogos de monometil-auristatina E y monometil-auristatina F); duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobin; pancratistatina; sarcodictina; espongiestatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucil, clomafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreuro de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina; 25 trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocin, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como antibiótico de enediina (p. ej., caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma11 y caliqueamicina phil1, véase, por ejemplo, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186; dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, como clodronato; esperamicina; como también cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibiótico cromoproteína enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (Adriamycin™) (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrin, estreptozocina, 30 tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracil (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterin, metotrexato, pteropterin, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, dromostanolona propionato, epitioestano, mepitioestano, testolactona; anti-adrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; repositores de ácido fólico tal como ácido frolinico; aceglatona; aldofosfamida glucósido; ácido aminolevulínico; eniluracil; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; democolcina; diaziquona; elfomitina; acetato de eliptinio; una epitolona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinan; lonidamina; maytansinoides tales como maytansina y ansamitocinas; mitoguaazona,

mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxana; rizoxina; sizofuran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-trichlorotriethylamine; tricotecanos (especialmente toxina T-2, verracurin A, roridin A y anguidina); uretan; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitabronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, p. ej., paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); clorambucil; gemcitabina (Gemzar™); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato ; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina Navelbine™; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterín; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácido so derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en la definición los agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores tales como anti-estrógenos y moduladores de los receptores de estrógenos receptivos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo Nolvadex™), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston™); inhibidores de aromatasas que inhiben la enzima aromatasas que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, megestrol acetato (Megace™), exemestano, formestano, fadrozol, vorozol (Rivisor™), letrozol (Femara™) y anastrozol (Arimidex™); y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácido so derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. Uno cualquiera o más de estos agentes se puede conjugar a los anticuerpos humanizados de la presente invención para proveer un agente terapéutico útil para el tratamiento de diversos trastornos.

Los anticuerpos también pueden conjugarse a profármacos. Un "profármaco" es un precursor o derivado de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxico para las células tumorales que el fármaco madre y es capaz de ser enzimáticamente activado o convertido en la forma más activa. Véanse, por ejemplo, Wilman, 1986, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", In Biochemical Society Transactions, 14, pág. 375-382, 615th Meeting Belfast y Stella et al., 1985, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", In: "Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press. Los profármacos útiles incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptido, profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen β-lactámicos, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituidos, y profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituidos, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que se pueden convertir en el fármaco libre citotóxico más activo. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivar en una forma de profármaco incluyen, aunque sin limitarse a ello, aquellos agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

Para fines diagnósticos como también de monitoreo terapéutico, los anticuerpos de la invención pueden también conjugarse a una etiqueta, o bien una etiqueta sola o a una etiqueta y un segundo agente adicional (profármaco, agente quimioterapéutico y similar). Una etiqueta, según se distingue de los otros segundos agentes, se refiere a un agente que es un compuesto o composición detectable y que puede conjugarse directa o indirectamente a un anticuerpo humanizado de la presente invención. La etiqueta puede ser en sí misma detectable (p. ej., etiquetas de radioisótopo o etiquetas fluorescentes) o, en el caso de una etiqueta enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable. El anticuerpo anti-CD40 humanizado marcado se puede preparar y usar en diversas aplicaciones que incluyen diagnósticos in vitro e in vivo.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden formular como parte de una preparación liposomal con el fin de efectuar su administración in vivo. Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta por diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos. Los liposomas son útiles en la administración a un mamífero de un compuesto o formulación, como un anticuerpo anti-CD40 humanizado descrito en la presente memoria, opcionalmente acoplado o en combinación con uno o más agentes farmacéuticamente activos y/o etiquetas. Los componentes del liposoma están comúnmente dispuestos en una formación de bicapa, similar a la disposición de lípidos de las membranas biológicas.

Ciertos aspectos de la presente invención relacionados con ácidos nucleicos aislados que codifican uno o más dominios de los anticuerpos humanizados de la presente invención. Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que es identificada y separada de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que se asocia comúnmente en la fuente natural del ácido nucleico del anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada se distingue de la molécula de ácido nucleico tal como existe en células naturales.

En diversos aspectos de la presente invención, uno o más dominios de los anticuerpos humanizados se expresarán de manera recombinante. Dicha expresión recombinante puede emplear una o más secuencias de control, es decir, secuencias de polinucleótidos necesarias para la expresión de una secuencia codificante operativamente unida en un organismo hospedante particular. Las secuencias de control adecuadas para uso en células procarióticas incluyen, por ejemplo, promotor, operador y secuencias del sitio de unión al ribosoma. Las secuencias de control eucariótico incluyen, aunque sin limitarse a ello, promotores, señales de poliadenilación y potenciadores. Estas secuencias de control se pueden utilizar para expresión y producción de anticuerpo anti-CD40 humanizado en células hospedantes procarióticas y eucarióticas.

Una secuencia de ácido nucleico está "operativamente unida" cuando se dispone en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, una presecuencia de ácido nucleico o líder secretor está operativamente unido a un ácido nucleico que codifica un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante si está posicionado como para facilitar la traducción. En general, "operativamente unido" significa que las secuencias de DNA que están siendo unidas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en marco de lectura. No obstante, los potenciadores son opcionalmente contiguos. La unión se puede lograr mediante ligadura en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se pueden utilizar enlazadores o adaptadores de oligonucleótidos sintéticos.

Como se emplean en esta memoria, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se utilizan intercambiamente y dichas designaciones incluyen su descendencia. Por lo tanto, "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeto primaria y los cultivos derivados de allí sin importar el número de transferencias.

El término "mamífero" para los fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domesticados y de granja, y animales de zoológico, deportivos o mascotas como perros, caballos, vacas y similares. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

Un "trastorno", como se usa en esta memoria, es cualquier estado que se beneficiaría del tratamiento con un anticuerpo anti-CD40 humanizado descrito en este documento. Esto incluye trastornos o enfermedades agudas o crónicas, incluyendo aquellas patologías que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitativos de trastornos a tratar en este documento incluyen cáncer, neoplasias hematológicas, tumores benignos y malignos, leucemias y tumores linfoides, y trastornos inflamatorios, angiogénicos, autoinmunitarios e inmunológicos.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen el estado fisiológico en mamíferos, que típicamente se caracteriza por una proliferación celular desregulada. Los ejemplos incluyen cáncer, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia.

Como se emplean en esta memoria, las expresiones "trastorno asociado a CD40" o "enfermedad asociada a CD40" se refieren a una afección en la que se indica la modificación o eliminación de células que expresan CD40. Esto incluye células que expresan CD40 que demuestran una proliferación anormal o células que expresan CD40 asociadas con tumores malignos o cancerosos. Ejemplos más particulares de tipos de cáncer que demuestran expresión anormal del antígeno CD40 incluyen células B linfoblastoides, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, linfoma de células T, sarcoma de Kaposi, osteosarcoma, tumores epidérmicos y endoteliales, pancreáticos, de pulmón, de mama, de ovario, de colon, de próstata, de cabeza y cuello, de piel (melanoma), de vejiga y de riñón. Dichos trastornos incluyen, aunque sin limitarse a ello, leucemias, linfomas, incluyendo linfoma de células B y linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström; tumores sólidos, incluyendo sarcomas, como osteosarcoma, sarcoma de Ewing, melanoma maligno, adenocarcinoma, incluyendo adenocarcinoma de ovario, sarcoma de Kaposi/tumor de Kaposi y carcinoma de células escamosas.

Un trastorno asociado a CD40 también incluye enfermedades y trastornos del sistema inmunitario, como trastornos autoinmunitarios y enfermedades inflamatorias. Dichas afecciones incluyen, aunque sin limitarse a ello, artritis reumatoide (RA), lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerodermia, síndrome de Sjögren, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal (p. ej., colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), inflamación pulmonar, asma y púrpura trombocitopénica idiopática (PTI).

La expresión "que cesa el crecimiento de" o "inhibidor del crecimiento" cuando se usa en esta memoria se refiere a inhibir el crecimiento o la proliferación de una célula, especialmente una célula neoplásica del tipo que expresa el antígeno CD40. Por lo tanto, la inhibición del crecimiento, por ejemplo, reduce significativamente el porcentaje de células neoplásicas en la fase S.

La expresión "infusión intravenosa" se refiere a la introducción de un agente en la vena de un animal o de un paciente humano durante un periodo superior a aproximadamente 15 minutos, en general entre aproximadamente 30 y 90 minutos.

La expresión "bolo intravenoso" se refiere a la administración de un fármaco en la vena de un animal o ser humano de modo tal que el cuerpo recibe el fármaco en aproximadamente 15 minutos o menos, en general 5 minutos o menos.

La expresión "administración subcutánea" se refiere a la introducción de un agente debajo de la piel de un animal o paciente humano, preferiblemente dentro de una cavidad entre la piel y el tejido subyacente, mediante administración relativamente lenta y sostenida desde un receptáculo con el fármaco. La punción de la piel hacia arriba y hacia afuera desde el tejido subyacente puede crear la cavidad.

La expresión "infusión subcutánea" se refiere a la introducción de un fármaco debajo de la piel de un animal o ser humano, preferiblemente dentro de una cavidad entre la piel y el tejido subyacente, mediante administración

relativamente lenta y sostenida desde un receptáculo con fármaco por un periodo de tiempo que incluye, aunque sin limitarse a ello, 30 minutos o menos, o 90 minutos o menos. Opcionalmente, la infusión puede realizarse por implante subcutáneo de una bomba de administración de fármacos implantada debajo de la piel del animal o ser humano, donde la bomba suministra una cantidad predeterminada de fármaco por un periodo de tiempo predeterminado, como 30 minutos, 90 minutos, o un tiempo que abarca la longitud del régimen de tratamiento.

La expresión "bolo subcutáneo" se refiere a la administración del fármaco debajo de la piel de un animal o ser humano, donde la administración del fármaco en bolo demora menos de aproximadamente 15 minutos; en otro aspecto, menos de 5 minutos e incluso en otro aspecto menos de 60 segundos. Incluso en otro aspecto, la administración se realiza dentro de una cavidad entre la piel y el tejido subyacente, donde la cavidad puede crearse mediante punción de la piel hacia arriba y hacia afuera del tejido subyacente.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se utiliza para hacer referencia a una cantidad de un agente activo que alivia o mejora uno o más de los síntomas del trastorno que se está tratando. Al hacerlo, es aquella cantidad que produce un resultado beneficioso en el paciente, por ejemplo, un efecto de cese del crecimiento, o que causa la eliminación de la célula. En un aspecto, la cantidad terapéuticamente eficaz tiene actividad apoptótica, o es capaz de inducir la muerte celular. En otro aspecto, la cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a una concentración en suero diana que se ha demostrado que es eficaz, por ejemplo, en demorar la progresión de la enfermedad. La eficacia se puede medir de manera convencional, dependiendo de la afección a tratar. Por ejemplo, en enfermedades o trastornos neoplásicos caracterizados por células que expresan CD40, la eficacia se puede medir evaluando el tiempo para la progresión de la enfermedad, o determinando los índices de respuesta.

Los términos "tratamiento" y "terapia" y similares, como se emplean en esta memoria, pretenden incluir medidas terapéuticas y profilácticas, o supresoras para una enfermedad o trastorno, conduciendo a cualquier efecto clínicamente conveniente o beneficioso, incluyendo, aunque sin limitarse a ello, el alivio de uno o más síntomas, la regresión, demora o cese de la progresión de la enfermedad o el trastorno. Por consiguiente, por ejemplo, el término tratamiento incluye la administración de un agente antes o después del inicio de un síntoma de una enfermedad o trastorno, previniendo o eliminando así uno o más signos de la enfermedad o el trastorno. Como otro ejemplo, el término incluye la administración de un agente después de la manifestación clínica de la enfermedad para combatir los síntomas de la enfermedad. Además, la administración de un agente después del inicio y después de que se han manifestado los síntomas clínicos donde la administración afecta los parámetros clínicos de la enfermedad o el trastorno, como el grado de lesión a los tejidos o la cantidad o grado de metástasis, ya sea que el tratamiento conduzca o no al alivio de la enfermedad, comprende "tratamiento" o "terapia" tal como se emplean en esta memoria. A su vez, siempre que las composiciones de la invención, o bien solas o en combinación con otro agente terapéutico alivien o disminuyan por lo menos un síntoma del trastorno que se esté tratando en comparación con ese síntoma en ausencia del uso de la composición de anticuerpo CD40 humanizado, el resultado debe considerarse un tratamiento eficaz del trastorno subyacente, independientemente de si se aliviaron todos los síntomas del trastorno o no.

El término "prospecto" se utiliza para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, administración, contraindicaciones y/o advertencias respecto del uso de dichos productos terapéuticos.

Anticuerpos

En la presente se describen anticuerpos anti-CD40 humanizados, y composiciones y artículos de fabricación que comprenden uno o más de los anticuerpos anti-CD40 humanizados de la presente invención. Además, se describen agentes de unión que incluyen un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD40 humanizado. Los anticuerpos anti-CD40 humanizados y los agentes de unión pueden cesar la proliferación de las células, causar la eliminación de células que expresan CD40 o inducir o causar un efecto citotóxico o citostático sobre las células diana. Los anticuerpos anti-CD40 humanizados y los agentes de unión se pueden utilizar en el tratamiento de una diversidad de enfermedades o trastornos caracterizados por la proliferación de células que expresan el antígeno de superficie CD40. Un anticuerpo anti-CD40 humanizado y un agente de unión CD40 incluyen cada uno por lo menos una porción que reconoce específicamente un epítipo CD40 (es decir, un fragmento de unión al antígeno).

En la caracterización inicial, se seleccionaron anticuerpos murinos en base a la caracterización de unión CD40.

A partir de estos estudios iniciales, se seleccionaron anticuerpos murinos que tenían regiones variables de cadena pesada, los cuales se muestran en la Tabla 1, y regiones variables de cadena ligera, los cuales se muestran en la Tabla 2:

Tabla 1: Anticuerpos murinos iniciales CD40 - Secuencias VH

2H11 EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDYVHWVKQRPEKGLEWIGR
 IDPEDGDSKYAPKFQGGKATMTADTSSNTAYLHLSLTS EDTAVYYCTTSY

YVGTYGYWGQGTTLTVSS (**SEQ ID NO:1**)
 EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDYIHWVKQRPEKGLEWIGR
 10F2 IDPEDGDTKYDPKFQGGKATMTADTSSNTAYLHLSSLTSEDVAVYYCTTSY
 YVGTYGYWGQGTTLTVSS(**SEQ ID NO:2**)
 EVQLQQSGAELVRPGASVQLSCTASGFNIKDYVHWVKQRPEKGLEWIGR
 19B10 IDPEDGDTKFAPKFQGGKATMTADTSSNTVYLHLSSLTSEDVAVYYCTTSY
 YVGTYGYWGQGTTLTVSS(**SEQ ID NO:3**)
 EVQLVESGGGLVKPGGSRKLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPEKGLEWVAY
 20E2 ISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDTALYYCARQD
 GYRYAMDYWGQGTSTVTVSS(**SEQ ID NO:4**)

TABLA 2: Anticuerpos murinos iniciales CD40 - Secuencias VK

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVSYMLWFQQKPGTSPKLWIYST
 2H11 SNLASGVPARFSGSGSSTISLRMEAEDAATYYCQQRTFYPYTFGGG
 TKLEIK (**SEQ ID NO:5**)
 QIVLTQSPTIMSASPGEKVIITCSATSSVSYILWFQQKPGTSPKLWIYST
 10F2 SNLASGVPARFSGSGSGASYSLTISRMEAEDAATYYCQQRTFYPYTFGGG
 TKLEIK (**SEQ ID NO:6**)
 QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVSYMLWFQQKPGTSPKLWIYST
 19B10 SNLASGVPARFSGSGSSTISLRMEAEDAATYYCQQRTFYPYTFGGG
 TKLEIK (**SEQ ID NO:7**)
 DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWHQQKPGQPP
 20E2 KLLIYWTSTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNLQAEDLAVYYCQNDYTY
 PLTFGAGTKLELK (**SEQ ID NO:8**)

5 Se seleccionaron secuencias flanqueantes humanas para cada ratón basándose en la homología estructural, estructura de CDR, restos canónicos conservados, restos de empaquetamiento de interfaz conservados y otros parámetros.

Los anticuerpos seleccionados de las CDR de cadena pesada y ligera murina de los diversos anticuerpos murinos se indican en las Tablas 3 y 4, respectivamente:

Tabla 3:

10

Secuencias CDR de CADENA PESADA

Nombre del constructo	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3
2H11	<u>GFNIK</u> DYYVH	<u>RIDPEDGDSKYAPKFQG</u>	SYVVGTYGY
	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:16

10F2	<u>GFNIK</u> <i>DYYIH</i>	<i>RIDPEDGDTKYDPKFQG</i>	<i>SYVVGTYGY</i>
	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:16
19B10	<u>GFNIK</u> <i>DYYVH</i>	<i>RIDPEDGDTKFAPKFQG</i>	<i>SYVVGTYGY</i>
	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:16
20E2	<u>GFTFS</u> <i>DYGMH</i>	<i>YISSGNRIIYYADTVKG</i>	<i>QDGYRYAMDY</i>
	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:17

5 El H-CDR1 anteriormente enumerado usa la secuencia que utiliza el sistema de numeración Chothia (Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948). La numeración Kabats para las secuencias se marca con texto en negrita y cursiva, y la numeración IMGT se muestra con texto subrayado de los residuos en la tabla de arriba para CDR1 y CDR2. Las secuencias para H-CDR3 para cada uno de 2H11, 10F2 y 19B10 es TTSYVVGTYGY (SEQ ID NO:77) y para 20E2 es ARQDGYRYAMDY (SEQ ID NO:78).

10

Tabla 4:
Secuencias CDR de CADENA LIVIANA

Nombre del constructo	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3
2H11	<i>SASSSVSYML</i>	<i>STSNLAS</i>	<i>QQRTFYPYT</i>
	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:24
10F2	<u>SAT</u> <i>SSVS</i> <i>YIL</i>	<i>STSNLAS</i>	<i>QQRTFYPYT</i>
	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:24
19B10	<i>SASSSVSYML</i>	<i>STSNLAS</i>	<i>QQRTFYPYT</i>
	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:24
20E2	<u>KSSQ</u> <i>SLLSGNQKNYLT</i>	<i>WTSTRES</i>	<i>QNDYTYPLT</i>
	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:25

15

Nuevamente, el sistema de numeración Chothia se utiliza en la Tabla 4 con la numeración Kabats para las secuencias marcada con texto en negrita y cursiva, y la numeración IMGT se muestra con texto subrayado.

20 Los Fab que mostraron una unión mejor o igual en comparación con el Fab original quimérico se seleccionaron para conversión a IgG. Los clones de la serie 20E2 se convirtieron a dos formatos IgG diferentes: a) IgG4DM (doble mutante) tiene dos mutaciones en la región Fc/bisagra, Ser228Pro que reduce la formación de un medio-molécula y Leu235Glu que reduce aún más la unión de FcγR. b) IgG1KO (bloqueo de funciones efectoras) tiene dos mutaciones en la región Fc, Leu234Ala y Leu235Ala, que reducen la función efectora tal como FcγR y la unión de complemento. Ambos formatos de IgG se describen en la bibliografía. El ejemplo 1 describe la humanización de tres candidatos en más detalle. Los resultados de dicha humanización produjeron secuencias de anticuerpo humanizado, que tienen las

25 secuencias de cadena pesada y ligera que se muestran a continuación:

Identidad	Secuencia	SEQ ID NO:
-----------	-----------	------------

ES 2 807 217 T3

<p>Anticuerpo A (Cadena ligera)</p>	<p><u>DIVMTQSPDLSAVSLGERATMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTW</u> <u>HQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVDRFSGSGSGTDFLLTIS</u> <u>SLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGKTKVEIKRTVAAPSVEFI</u> FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYLSSTLLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC</p>	<p>26</p>
<p>Anticuerpo A (Cadena pesada, IgG1KO)</p>	<p><u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGLTLVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCKDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>27</p>
<p>Anticuerpo A (Cadena pesada, IgG1)</p>	<p><u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGLTLVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCKDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>28</p>
<p>Anticuerpo A (Cadena pesada, IgG4DM)</p>	<p><u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGLTLVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVN HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPKPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK</p>	<p>29</p>

ES 2 807 217 T3

<p>Anticuerpo A (Pesada, IgG1KOb)</p>	<p><u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWRQAP</u> <u>GKLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWAQGLTVTVSS</u>ASTK GPSVFFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>30</p>
<p>Anticuerpo B (Cadena ligera)</p>	<p><u>DIVMTQSPDSLAVSLGEKVTINCKSSQSLNSGNQKNYL</u> <u>TWHQOKPGQFPKLLIYWTSTRESGVDRFSGSGSGTDF</u> <u>LTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGTKVEIKR</u>TVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>	<p>31</p>
<p>Anticuerpo B (Cadena pesada, IgG1KO)</p>	<p><u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWRQAP</u> <u>GKLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGLTVTVSS</u>ASTK GPSVFFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>32</p>
<p>Anticuerpo B (Cadena pesada, IgG1)</p>	<p><u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWRQAP</u> <u>GKLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGLTVTVSS</u>ASTK GPSVFFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>33</p>
<p>Anticuerpo B (Cadena pesada, IgG4 DM)</p>	<p><u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWRQAP</u> <u>GKLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGLTVTVSS</u>ASTK GPSVFFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEFEGGSPVFLFPKPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK</p>	<p>34</p>

ES 2 807 217 T3

<p>Anticuerpo B (Cadena pesada, IgG1KOb)</p>	<p><u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCCAASGFTFSDYGMHVWRQAP</u> <u>GRGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLVTVSS</u>ASTK GPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>35</p>
<p>Anticuerpo C (Cadena ligera)</p>	<p><u>DIQMTQSPPSSLASVGDRVITITCSASSSVSYMLWFQ</u> <u>QKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSDFTL</u> <u>TISSLQPEDFATYYCQRTFTYPYTFGGGTKVEIKRT</u> VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>	<p>36</p>
<p>Anticuerpo C (Cadena pesada, IgG1KO)</p>	<p><u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVYVHVWKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLVTVSS</u>ASTKG PSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH ARTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>37</p>
<p>Anticuerpo C (Cadena pesada, IgG1)</p>	<p><u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVYVHVWKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLVTVSS</u>ASTKG PSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPAPELLGGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH ARTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>38</p>
<p>Anticuerpo C (Cadena pesada, IgG4 DM)</p>	<p><u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVYVHVWKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLVTVSS</u>ASTKG PSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPEFEGGPSVFLFPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSDEPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK</p>	<p>39</p>

<p>Anticuerpo C (Cadena pesada, IgG1KOb)</p>	<p><u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSCTASGFINIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFKQKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTGYGQGTLVTVSS</u>ASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPP KPKDTLMISRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>40</p>
--	--	-----------

5 En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado puede, por ejemplo, bloquear la proliferación o detener de otro modo el crecimiento de una célula o provocar su agotamiento, muerte o, de otro modo, su eliminación, por ejemplo, mediante la unión del antígeno de superficie CD40. Por ejemplo, en tumores malignos de células T y B, los efectos antitumorales (p. ej., cese del crecimiento con o sin eliminación celular o apoptosis) a menudo resulta cuando las células malignas se exponen a estímulos que conducen a la activación de linfocitos normales. Esta detención del crecimiento inducida por activación se ha observado con señales a través de receptores de antígenos o receptores coestimuladores (véanse, por ejemplo, Ashwell et al., 1987, Science 237:61; Bridges et al., 1987, J. Immunol. 139:4242; Page y Defranco, 1988, J. Immunol. 140:3717; y Beckwith et al., 1990, J. Natl. Cancer Inst. 82:501). La estimulación CD40, como resultado de la unión específica mediante un anticuerpo o un ligando soluble, inhibe el crecimiento del linfoma de células B (véase, p. ej., Funakoshi et al., 1994, Blood 83:2787-2794). Los agentes que inhiben el crecimiento de células malignas de esta manera y que se dirigen contra el antígeno de superficie CD40 son ejemplos de agentes apropiados.

15 Los agentes específicos de CD40 incluyen el fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD40 humanizado que se une a CD40 (p. ej., CD40 humana o su variante). Los agentes y anticuerpos específicos de CD40 se pueden conjugar opcionalmente o condensarse a un agente citotóxico o quimioterapéutico. En aspectos en los que el anticuerpo humanizado se une al antígeno de superficie CD40 y causa la reducción de los tipos de células que expresan CD40, la unión en general se caracteriza por autodirigir la célula del antígeno de superficie CD40 in vivo. Los agentes de unión adecuados unen el antígeno CD40 con suficiente afinidad y/o avidéz como para que el agente específico de CD40 sea útil como agente terapéutico dirigiendo específicamente una célula que expresa el antígeno.

20 En algunos aspectos, el anticuerpo humanizado disminuye la unión del ligando CD40 a CD40 en por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 60% o por lo menos 75% o por lo menos 80%, o por lo menos 90%, o por lo menos 95%.

25 Los anticuerpos anti-CD40 humanizados descritos en este documento comprenden una secuencia de aminoácidos de los restos derivados de las CDR Anticuerpo A (no según la invención: secuencia de cadena pesada = SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28; SEQ ID NO:29 o SEQ ID NO:30; secuencia de cadena ligera = SEQ ID NO:26), Anticuerpo B (según la invención excepto para SEQ ID NO:34: secuencia de cadena pesada = SEQ ID NO:32; SEQ ID NO:33; SEQ ID NO:34; o SEQ ID NO:35; secuencia de cadena ligera = SEQ ID NO:31) y Anticuerpo C (no según la invención: secuencia de cadena pesada = SEQ ID NO:37; SEQ ID NO:38; SEQ ID NO:39 o SEQ ID NO:40; secuencia de cadena ligera = SEQ ID NO:36) descrita en este documento arriba y restos de aminoácidos derivados de regiones marco de una inmunoglobulina humana. Los anticuerpos anti-CD40 humanizados opcionalmente incluyen sustituciones de aminoácidos específicas en las regiones consenso o flanqueantes de línea germinal.

35 La sustitución específica de restos aminoacídicos en estas posiciones flanqueantes puede mejorar varios aspectos del comportamiento del anticuerpo, incluyendo la afinidad de unión y/o estabilidad, con respecto a lo demostrado en anticuerpos humanizados formados por "cambio directo" de CDR o HVL en regiones flanqueantes de línea germinal humana, como se muestra en los ejemplos a continuación.

40 También se describen en este documento anticuerpos monoclonales con secuencias de cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4 y secuencias de cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 8 (véanse las Tablas 1 y 2 anteriores). La secuencia CDR de estos anticuerpos murinos que se muestran en las Tablas 3 y 4, disponiendo dichas CDR en FR en dominios variables de cadenas pesada y ligera de consenso humano producirán los anticuerpos humanizados útiles de la presente invención.

45 Los anticuerpos anti-CD40 humanizados descritos en la presente comprenden al menos un dominio variable de cadena pesada o ligera que comprende las CDR o HVL de los anticuerpos monoclonales murinos como se muestra en las Tablas 1 a 4 anteriores y las FR de los dominios variables de la cadena germinal humana pesada y ligera. Los anticuerpos humanizados creados en la presente invención son: Anticuerpo A, Anticuerpo B y Anticuerpo C y las diversas secuencias de cadena pesada y ligera del mismo se muestran en las SEQ ID NO: 26 a SEQ ID NO: 40.

En realizaciones específicas, se contemplan anticuerpos que tienen una secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO:33 o SEQ ID NO SEQ ID NO:35, en combinación con una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO:31.

5 Las CDR de estas secuencias se muestran en las Tablas 3 y 4. Se contempla que los anticuerpos quiméricos con las regiones CDR conmutadas (es decir, por ejemplo cambiando una o dos CDR de Anticuerpo A con la CDR análoga del Anticuerpo C) entre estas inmunoglobulinas ejemplares también pueden producir anticuerpos útiles.

También se describe en este documento que el anticuerpo anti-CD40 humanizado es un fragmento de anticuerpo. Se han descrito anteriormente en general diversos fragmentos de anticuerpos y se han creado técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos pueden derivarse mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véanse, p. ej., Morimoto et al., 1992, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117; y Brennan et al., 1985, Science 229:81). Alternativamente, los fragmentos pueden producirse directamente en células hospedantes recombinantes. Por ejemplo, fragmentos de Fab'-SH pueden recuperarse directamente de E. coli y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (véase, p. ej., Carter et al., 1992, Bio/Technology 10:163-167). Mediante otro planteamiento, los fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente a partir de un cultivo de células hospedantes recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán obvias para el experto en la técnica

En algunas realizaciones, el anticuerpo incluye una región constante que media la función efectora. La región constante puede proveer respuestas de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC), fagocitosis celular dependiente del anticuerpo (ADCP) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) contra una célula diana que expresa CD40. El(los) dominio(s) efector(es) puede(n) ser, por ejemplo, una región Fc de una molécula de Ig. Típicamente, el agente de unión CD40 recoge y/o activa glóbulos blancos citotóxicos (p. j., linfocitos citotóxicos naturales (NK), células fagocíticas (p. ej., macrófagos) y/o componentes de complemento en suero).

El dominio efector de un anticuerpo puede pertenecer a cualquier especie e isotipo de animal vertebrado adecuado. Los isotipos de diferentes especies animales difieren en su capacidad de mediar las funciones efectoras. Por ejemplo, la capacidad de la inmunoglobulina humana de mediar CDC y ADCC/ADCP está en general en el orden de IgM≈IgG₁≈IgG₃>IgG₂>IgG₄ y IgG₁≈IgG₃>IgG₂/IgM/IgG₄, respectivamente. Las inmunoglobulinas murinas median CDC y ADCC/ADCP en general en el orden de IgM≈IgG₃>>IgG_{2b}>IgG_{2a}>>IgG₁ y IgG_{2b}>IgG_{2a}>IgG₁>>IgG₃ murina, respectivamente. En otro ejemplo, la IgG_{2a} murina media ADCC mientras que ambas IgG_{2a} y IgM murinas median CDC.

Modificaciones de anticuerpos

Los anticuerpos y agentes anti-CD40 humanizados pueden incluir modificaciones del anticuerpo anti-CD40 humanizado. Por ejemplo, puede ser conveniente modificar el anticuerpo con respecto a la función efectora, como para potenciar la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer. Dicha modificación es la introducción de residuo(s) cisteína en la región Fc, permitiendo así la formación del enlace disulfuro intercatenar en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener mejor capacidad de internalización y/o mayor destrucción celular mediada por complemento y/o citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Véanse, por ejemplo, Caron et al., 1992, J. Exp Med. 176:1191-1195; y Shopes, 1992, J. Immunol. 148:2918-2922. Los anticuerpos homodiméricos que tienen mejor actividad antitumoral pueden también prepararse usando entrecruzadores heterobifuncionales, como se describe en Wolff et al., 1993, Cancer Research 53: 2560-2565. Alternativamente, un anticuerpo puede modificarse para contener regiones Fc duales, potenciando la lisis complementaria y las capacidad de ADCC del anticuerpo. Véase Stevenson et al., 1989, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230.

Los anticuerpos con mejor capacidad de soportar ADCC se han generado modificando el patrón de glucosilación de su región Fc. Esto es posible ya que la glucosilación del anticuerpo en el residuo asparagina, N297, en el dominio CH₂ está implicada en la interacción entre los receptores IgG y Fcγ de pre-requisito para ADCC. Se han modificado líneas de células hospedantes para expresar anticuerpos con glucosilación alterada, como mayor N-acetilglucosamina de bisección o menor fucosa. La reducción de fucosa provee mayor potenciación de la actividad ADCC que lo que se logra aumentando la presencia de N-acetilglucosamina de bisección. Además, la potenciación de ADCC por anticuerpos de baja fucosa es independiente del polimorfismo FcγRIIIa V/F.

La modificación de la secuencia de aminoácidos de la región Fc de anticuerpos es una alternativa a la modificación de glucosilación para potenciar ADCC. El sitio de unión en IgG1 humana para receptores Fcγ se ha determinado mediante un amplio análisis mutacional. Esto condujo a la generación de anticuerpos IgG1 humanizados con mutaciones Fc que aumentan la afinidad de unión hacia FcγRIIIa y potencian ADCC in vitro. Además, se han obtenido variantes de Fc con muchas permutaciones de propiedades de unión diferentes, p. ej., mejor unión a receptores FcγR específicos con unión inalterada o disminuida a otros receptores FcγR.

Otro aspecto incluye inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo humanizado conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de

origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunocombinados se ha descrito precedentemente en este documento. Las toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos que se pueden utilizar para formar inmunocombinados útiles incluyen cadena de difteria A, fragmentos activos que no son de unión de la toxina de la difteria, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, proteínas alfa-sarcina, Aleurites fordii, proteínas diantina, proteínas *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcína, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, los tricotecenos y similares. Están disponibles una diversidad de radionúclidos para la producción de anticuerpos anti-CD40 humanizados radioconjugados. Los ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re .

Los combinados del anticuerpo anti-CD40 humanizado y el agente citotóxico o quimioterapéutico pueden realizarse por métodos conocidos, usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como HCL de dimetil adipimidato), ésteres activos (como disuccinimidil suberato), aldehídos (como glutaraldehído), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos bis-fluoro activos (como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar como se describe en Vitetta et al., 1987, *Science* 238:1098. El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminedipentacético (MX-DTPA) marcado con carbón 14 es un agente quelante ilustrativo para conjugación del radionucleótido al anticuerpo. Los combinados también se pueden formar con un enlazador escindible.

En otra realización, el anticuerpo puede conjugarse a un "receptor" (como estreptavidina) para utilización en la prediana de tumores. En este procedimiento, el combinado anticuerpo-receptor se administra a un paciente tras la eliminación de combinado no unido de la circulación, usando un agente depurador y luego administración de un "ligando" que se une selectivamente al receptor (p. ej., avidina), siendo el ligando combinado a un agente citotóxico (p. ej., un radionúclido).

Los anticuerpos anti-CD40 humanizados descritos en esta memoria pueden también formularse como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por métodos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688; Hwang et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4030; y las patentes de EE. Nos. 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas que tienen un tiempo de circulación mejorado se describen, por ejemplo, en la patente de los EE.UU. No. 5.013.556.

Los liposomas particularmente útiles se pueden generar por el método de evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para proveer liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' de un anticuerpo descrito en esta memoria pueden conjugarse a los liposomas como se describe en Martin et al., 1982, *J. Biol. Chem.* 257:286-288 mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico (tal como doxorubicina) está opcionalmente contenido dentro del liposoma. Véase, p. ej., Gabizon et al., 1989, *J. National Cancer Inst.* 81(19):1484.

Los anticuerpos descritos en este documento pueden también utilizarse en procedimientos ADEPT (Terapia de Profármacos y Enzimas Dirigida por Anticuerpos), combinando el anticuerpo a una enzima activadora del profármaco que lo convierte en un profármaco (p. ej., un agente quimioterapéutico de peptidilo), para un fármaco activo antineoplásico. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 81/01145, WO 88/07378, y la patente de EE.UU. No. 4.975.278. El componente enzimático del inmunocombinado útil para ADEPT es una enzima capaz de actuar sobre un profármaco de manera tal de convertirlo en su forma citotóxica más activa. Las enzimas específicas útiles en procedimientos ADEPT incluyen, aunque sin limitarse a ello, fosfatasa alcalina para convertir profármacos que contienen fosfatasa en fármacos libres; arilsulfatasa para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina deaminasa para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco antineoplásico, 5-fluorouracil; proteasas, como serratina proteasa, termosilina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (como catepsinas B y L), para convertir profármacos que contienen péptido en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácido; enzimas que escinden los carbohidratos tales como β -galactosidasa y neuraminidasa para convertir profármacos glucosilados en fármacos libres; β -lactamasa para convertir fármacos derivados con β -lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasa, como penicilina amidasa V o penicilina amidasa G, para convertir fármacos derivados en sus amina nitrógenos con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, los anticuerpos que tienen actividad enzimática ("abzimas") se pueden utilizar para convertir los profármacos en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, 1987, *Nature* 328: 457-458). Los combinados de anticuerpo-abzima pueden prepararse por métodos conocidos para administración de la abzima a una población de células tumorales, por ejemplo, uniendo covalentemente la enzima al anticuerpo anti-CD40 humanizado/reactivos de entrecruzamiento heterobifuncionales anteriormente analizados. Alternativamente, las proteínas de fusión que comprenden por lo menos la región de unión al antígeno de un anticuerpo descrito en este documento unida a por lo menos una porción funcionalmente activa de

una enzima ya descrita en este documento, se pueden construir usando técnicas de DNA recombinante (véase, por ejemplo, Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608).

Como se describe en este documento, puede ser deseable usar un fragmento de anticuerpo anti-CD40 humanizado, en lugar de un anticuerpo intacto, para aumentar la penetración del tumor, por ejemplo. Puede ser conveniente modificar el fragmento de anticuerpo con el fin de aumentar su semivida en suero. Esto se puede lograr, por ejemplo, por incorporación de un epítipo de unión al receptor de rescate en el fragmento de anticuerpo. En un método, la región apropiada del fragmento de anticuerpo puede alterarse (p. ej, mutarse), o el otro epítipo puede incorporarse en una marca de péptido que luego se condensa al fragmento de anticuerpo en alguno de los extremos o en el medio, por síntesis de DNA o peptídica. Véase, p. ej., el documento WO 96/32478.

En ciertas realizaciones, también se incluyen modificaciones covalentes del anticuerpo anti-CD40 humanizado. Las modificaciones covalentes incluyen la modificación de residuos cisteinilo, residuos histidilo, residuos lisinilo y residuos aminoterminales, residuos arginilo, residuos tirosilo, grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo), residuos glutaminilo y asparaginilo, o residuos serilo o treonilo. Otro tipo de modificación covalente implica glucósidos de acoplamiento química o enzimáticamente acoplados al anticuerpo. Dichas modificaciones pueden realizarse por síntesis química o por escisión enzimática o química del anticuerpo, si corresponde. Otros tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo se pueden introducir en la molécula, haciendo reaccionar los residuos aminoácido direccionados del anticuerpo con un agente de derivatización orgánico que sea capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o residuos amino o carboxiterminales.

La eliminación de cualquier resto carbohidrato presente en el anticuerpo puede llevarse a cabo química o enzimáticamente. La deglucosilación química es descrita por Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y por Edge et al., 1981, Anal. Biochem., 118:131. La escisión enzimática de restos carbohidrato en anticuerpos puede lograrse mediante el uso de una diversidad de endo y exo-glucosidasas tales como las descritas por Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol 138:350.

Otro tipo de modificación covalente útil comprende unir el anticuerpo a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera establecida en una o más de la patente de EE.UU. N° 4.640.835, patente de EE.UU. N° 4.496.689, patente de EE.UU. N° 4.301.144, patente de EE.UU. N° 4.670.417, patente de EE.UU. N° 4.791.192 y patente de EE.UU. N° 4.179.337.

Humanización y variantes de secuencias de aminoácidos

Pueden prepararse variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-CD40 mediante la introducción de cambios de nucleótidos apropiados en el DNA del anticuerpo anti-CD40, o por síntesis de péptidos. Estas variantes incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-CD40 de los ejemplos proporcionados en la presente memoria. Se realiza cualquier combinación de deleciones, inserciones y sustituciones para conseguir la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar procesos postraduccionales del anticuerpo anti-CD40 humanizado o variante, tal como cambiando el número de posición de sitios de glucosilación.

Un método útil para la identificación de ciertos restos o regiones del anticuerpo anti-CD40 que son localizaciones preferidas para mutagénesis se denomina "mutagénesis mediante alanina," como se describe por Cunningham y Wells (Science, 244:1081-1085 (1989)). En este caso, se identifica un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (típicamente alanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno CD40. Después se refinan las localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones mediante la introducción de variantes adicionales u otras variantes en o para sitios de sustitución. De esta manera, mientras que el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácido está predeterminado, no necesita predeterminarse la naturaleza de la mutación per se. Por ejemplo, para analizar el comportamiento de una mutación en un sitio dado, se realiza mutagénesis mediante alanina o mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y se exploran las variantes de anticuerpo anti-CD40 expresadas con respecto a la actividad deseada.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que varían en longitud desde un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de uno solo o múltiples restos aminoácidos. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo anti-CD40 fusionado a un marcador de epítipo. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo anti-CD40 incluyen una fusión al extremo C-terminal Nor del anticuerpo anti-CD40 de una enzima o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un resto aminoácido en la molécula de anticuerpo anti-CD40 retirada y un resto diferente insertado en su sitio. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones en FR. En la Tabla 5 se proporcionan sustituciones conservadoras bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Si estas sustituciones ocasionan un cambio en la actividad biológica, pueden introducirse

cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares", o como se describe más adelante en relación con las clases de aminoácidos, y pueden explorarse los productos.

TABLA 5:

Residuo Original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	arg; asn; gln; lys;	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	ile; norleucina; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	tyr; leu; val; ile; ala;	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	phe; trp; thr; ser	phe
Val (V)	leu; ile; met; phe ala; norleucina;	leu

5 En la química de proteínas, generalmente se acepta que las propiedades biológicas del anticuerpo se pueden lograr seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre al mantener (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Los restos naturales se dividen en grupos basándose en propiedades comunes de las cadenas laterales:

- (1) hidrófoba: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- 10 (2) hidrófila neutra: cys, ser, thr;
- (3) ácida: asp, glu;
- (4) básica: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y

(6) aromática: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservadoras incluirán cambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

5 También puede sustituirse cualquier resto de cisteína no implicada en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo humanizado anti-CD40 o variante, generalmente por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula, prevenir el entrecruzamiento aberrante o proporcionar puntos de conjugación establecidos con un compuesto citotóxico o citostático. Por el contrario, puede añadirse uno o más enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv).

10 Un tipo de variante de sustitución implica la sustitución de uno o más restos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante o variantes seleccionadas para el desarrollo adicional tendrán mejores propiedades biológicas que el anticuerpo parental a partir del cual se generaron. Una forma conveniente para generar estas variantes de sustitución es mediante maduración de afinidad usando presentación en fagos. En resumen, se hacen mutar varios sitios de regiones hipervariables (por ejemplo 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Las variantes de anticuerpo así generadas se manifiestan de una manera monovalente en partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto del gen III del fago M13 empaquetados dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos después se exploran con respecto a su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión). Para identificar sitios de regiones hipervariables candidatas para la modificación, puede realizarse mutagénesis mediante alanina para identificar restos de región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Como alternativa, o además, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo de antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo CD40 y Dabigatrán humano. Estos restos de contacto y los restos próximos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en la presente memoria. Una vez que se han generado estas variantes, el panel de variantes se somete a la exploración como se describe en la presente memoria y pueden seleccionarse anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para un desarrollo adicional.

Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glucosilación original del anticuerpo. Por "alteración" se entiende la delección de uno o más restos de carbohidrato encontrados en el anticuerpo, y/o la adición de uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo.

30 En algunas realizaciones, puede ser deseable modificar los anticuerpos de la invención para añadir sitios de glucosilación. La glucosilación de los anticuerpos típicamente es una N-glucosilación o una O-glucosilación. N-glucosilación se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en la que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. De esta manera, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La O-glucosilación se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. De esta manera, para glucosilar una proteína dada, por ejemplo un anticuerpo, la secuencia de aminoácidos de la proteína se modifica por ingeniería genética para que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de N-glucosilación). La alteración también puede realizarse mediante la adición de, o la sustitución de, uno o más restos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original (para sitios de O-glucosilación).

45 Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia del anticuerpo anti-CD40 se preparan por una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, aunque sin limitarse a ello, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos que ocurren naturalmente) o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis PCR y mutagénesis cassette de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo anti-CD40.

Polinucleótidos, vectores, células hospedantes y métodos recombinantes

50 Otras realizaciones abarcan polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia que codifica un anticuerpo anti-CD40 humanizado, vectores y células hospedantes que comprenden los polinucleótidos, y técnicas recombinantes para la producción del anticuerpo humanizado. Los polinucleótidos aislados pueden codificar cualquier forma deseada del anticuerpo anti-CD40 incluyendo, por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa.

55 Algunas realizaciones incluyen polinucleótidos aislados que comprenden secuencias que codifican un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de cualquiera de SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33 o SEQ ID NO:35. Algunas realizaciones incluyen polinucleótidos aislados que comprenden secuencias que codifican un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:31.

En un aspecto, la secuencia o secuencias de polinucleótidos aisladas codifica un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de

SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO:31, respectivamente; SEQ ID NO:33 y SEQ ID NO:31, respectivamente; SEQ ID NO:35 y SEQ ID NO:31, respectivamente.

El o los polinucleótidos que comprenden una secuencia que codifica un anticuerpo anti-CD40 humanizado o una cadena de los mismos se pueden fusionar a una o más secuencias reguladoras o de control, como se conoce en la técnica, y pueden estar contenidos en vectores de expresión adecuados u células hospedadoras como se conoce en la técnica. Cada una de las moléculas de polinucleótidos que codifica los dominios variables de cadena pesada y ligera puede condensarse independientemente a una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio constante, como un dominio constante humano, permitiendo la producción de anticuerpos intactos. Alternativamente, los polinucleótidos o sus porciones se pueden condensar entre sí, proporcionando un molde para la producción de un anticuerpo monocatenario.

Para producción recombinante, un polinucleótido que codifica el anticuerpo se inserta en un vector replicable para clonación (amplificación del DNA) o para expresión. Existen muchos vectores adecuados para expresar el anticuerpo recombinante. Los componentes del vector en general incluyen, aunque sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de transcripción.

Los anticuerpos anti-CD40 humanizados pueden también producirse como polipéptidos de fusión, en los cuales el anticuerpo se condensa con un polipéptido heterólogo, como una secuencia de señal u otro polipéptido que tienen un sitio de escisión específico en el término amino de la proteína o el polipéptido maduro. La secuencia de señal heteróloga seleccionada es típicamente una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa de señal) por una célula hospedante. Para células hospedantes procarióticas que no reconocen ni procesan la secuencia de señal del anticuerpo anti-CD40 humanizado, la secuencia de señal puede sustituirse con una secuencia de señal procariótica. La secuencia de señal puede ser, por ejemplo, una fosfatasa alcalina, penicilinas, lipoproteína, enterotoxina termoestable II inicial y similares. Para la secreción de levadura, la secuencia de señal nativa puede sustituirse, por ejemplo, con una secuencia inicial obtenida de invertasa alfa-factor de levadura (incluyendo iniciadores del α -factor de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), fosfatasa ácida, glucoamilasa de *C. albicans* u otra señal descrita en el documento WO90/13646. En células mamíferas, se pueden usar las secuencias de señal mamíferas, como también los iniciadores secretores víricos, por ejemplo, la señal del virus del herpes simple gD. El DNA para dicha región precursora se liga en el marco de lectura al DNA que codifica el anticuerpo anti-CD40 humanizado.

Los vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células hospedantes seleccionadas. En general, en los vectores de clonación, esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del DNA cromosómico hospedante, e incluye orígenes de replicación o secuencias que se replican de manera autónoma. Dichas secuencias se conocen por una diversidad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido 2-u. es adecuado para levadura, y diversos orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV y BPV) son útiles para clonar vectores en células de mamífero. En general, el origen de replicación del componente de replicación no es necesario para vectores de expresión mamífera (el origen SV40 puede usarse típicamente solamente porque contiene el promotor temprano).

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen que codifica un marcador seleccionable para facilitar la identificación de expresión. Los genes de marcadores seleccionables típicos codifican proteínas que confieren resistencia a los antibióticos u otras toxinas, p. ej., ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, o alternativamente, son deficiencias auxotróficas de complemento, o en otras alternativas suministran nutrientes específicos que no están presentes en medios complejos, p. ej., el gen que codifica D-alanina racemasa para *Bacilli*.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para cesar el crecimiento de una célula hospedante. Aquellas células que son exitosamente transformadas con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a los fármacos y, por lo tanto, sobrevive al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina. Los marcadores seleccionables comunes para células mamíferas son aquellos que permiten la identificación de células competentes para tomar un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-CD40 humanizado, tal como DHFR (dihidrofolato reductasa), timidina cinasa, metalotioneína-I y -II (como genes de metalotioneína de primate), adenosina desaminasa, ornitina decarboxilasa, y similares. Las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican primero cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula hospedante apropiada cuando se emplea DHFR de tipo salvaje es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad de DHFR (p. ej., DG44).

Alternativamente, las células hospedantes (particularmente las hospedantes de tipo salvaje que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de DNA que codifican el anticuerpo anti-CD40, la proteína DHFR de tipo salvaje y otro marcador seleccionable tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH), pueden seleccionarse por crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable, tal como un antibiótico aminoglucosídico, p. ej., kanamicina, neomicina o G418. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 4.965.199.

Si la producción recombinante se realiza en una célula de levadura como célula hospedante, el gen TRP1 presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb et al., 1979, Nature 282: 39) se puede utilizar como marcador seleccionable. El gen TRP1 provee un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo ATCC No. 44076 o PEP4-1 (Jones, 1977, Genetics 85:12). La presencia de la lesión *trp1* en el genoma de la célula hospedante de levadura provee entonces un entorno eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano. De manera similar, las cepas de levadura deficientes de *Leu2p*, como ATCC 20,622 y 38,626, se complementan con plásmidos conocidos que portan el gen LEU2.

Además, los vectores derivados del plásmido pKD1 circular de 1,6 μ m se pueden usar para la transformación de levaduras *Kluyveromyces*. Alternativamente, se reportó un sistema de expresión para producción a gran escala de quimosina de ternero recombinante para *K. lactis* (Van den Berg, 1990, Bio/Technology 8:135). También se han descrito vectores de expresión de múltiples copias, estables, para la secreción de albúmina de suero recombinante madura por cepas industriales de *Kluyveromyces* (Fleer et al., 1991, Bio/Technology 9:968-975).

Los vectores de expresión y clonación usualmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo hospedante y está operativamente unido a la molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-CD40 o su cadena de polipéptidos. Los promotores adecuados para uso con hospedantes procarióticos incluyen un promotor *phoA*, β -lactamasa y sistemas promotores de lactosa, fosfatasa alcalina, sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. También son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) operativamente unida al DNA que codifica el anticuerpo anti-CD40 humanizado.

Se conocen muchas secuencias promotoras eucarióticas. Virtualmente, todos los genes eucarióticos poseen una región AT-rich ubicada aproximadamente 25 a 30 bases aguas arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia hallada 70 a 80 bases aguas arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en la que N puede ser un nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucarióticos se encuentra una secuencia AATAAA que puede ser la señal para adición del extremo poly A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan adecuadamente en vectores de expresión eucariótica.

Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para uso con hospedantes de levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato decarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosefosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa.

Los promotores inducibles tienen la ventaja adicional de transcripción controlada por condiciones de crecimiento. Esto incluye las regiones promotoras de levadura para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas derivadas asociadas con el metabolismo de nitrógeno, metalotienina, glicerilaldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión de levadura se describen también en el documento EP 73.657. Los potenciadores de levadura se utilizan también ventajosamente con promotores de levadura.

La transcripción del anticuerpo anti-CD40 humanizado desde vectores en células hospedantes mamíferas es controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el poliovirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (como Adenovirus 2), papiloma virus bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de hepatitis B y virus símico 40 (SV40), de promotores mamíferos heterólogos, p. ej., el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, o de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedantes.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción SV40 que también contiene el origen vírico de replicación de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano convenientemente se obtiene como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresar ADN en huéspedes mamíferos que usan el virus del papiloma bovino como vector se describe en la patente de los EE.UU. No. 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de EE.UU. No. 4.601.978. Véase también Reyes et al., 1982, Nature 297:598-601, que describe la expresión del cDNA del p-interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple. Alternativamente, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous se puede utilizar como promotor.

Otro elemento útil que se puede emplear en un vector de expresión recombinante es una secuencia potenciadora, que se utiliza para aumentar la transcripción de un DNA que codifica un anticuerpo anti-CD40 humanizado mediante eucariotas superiores. Muchas secuencias potenciadoras se conocen ahora a partir de genes mamíferos (p. ej., globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Típicamente, no obstante, se emplea un potenciador proveniente de virus de células eucarióticas. Los ejemplos incluyen el potenciador SV40 en el lateral tardío del origen de replicación (bp 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador del poliovirus en el lateral tardío del origen de replicación y los potenciadores del adenovirus. Véase también Yaniv, 1982, Nature 297:17-18 para una descripción de los elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas.

El potenciador puede empalmarse en el vector en la posición 5' o 3' a la secuencia codificante del anticuerpo anti-CD40 humanizado, pero preferiblemente se ubica en el sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión utilizados en células hospedantes eucarióticas (levadura, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) pueden también contener secuencias necesarias para la terminación de transcripción y para estabilizar el mRNA. Dichas secuencias comúnmente están disponibles desde el extremo 5' y ocasionalmente 3', regiones no traducidas de DNA o cDNA eucarióticos o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del mRNA que codifica el anticuerpo anti-CD40. Un componente de terminación de transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión utilizado en el mismo. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD40 humanizados se pueden expresar utilizando el sistema CHEF. (Véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 5.888.809).

Las células hospedantes adecuadas para clonar o expresar el DNA en los vectores de este documento son procariotas, levadura o eucariotas superiores que ya se han descrito en este documento. Las procariotas adecuadas para este propósito incluyen eubacterias, tales como organismos gramnegativos y grampositivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae como *Escherichia*, p. ej., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, p. ej., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, p. ej., *Serratia marcescans* y *Shigella*, como también Bacilli tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (p. ej., *B. licheniformis* 41 P descrita en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un hospedante de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31,446), aunque son adecuadas también otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27,325). Estos ejemplos son ilustrativos y no limitativos.

Además de las procariotas, los microbios eucarióticos tales como levaduras u hongos filamentosos son hospedantes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican el anticuerpo anti-CD40. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura de panadería, es la que se utiliza más comúnmente entre los microorganismos hospedantes eucarióticos inferiores. Sin embargo, se dispone comúnmente de una cantidad de otros géneros, especies y cepas que son útiles para la presente invención, como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedantes de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilorum* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos, como por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y hospedantes de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células hospedantes adecuadas para la expresión del anticuerpo anti-CD40 humanizado, glucosilado derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insectos, incluyendo, p. ej., numerosas cepas baculovíricas y variantes, y las correspondientes células hospedantes de insectos permisivas como *Spodoptera frugiperda* (cienpies), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca mediterránea) y *Bombyx mori* (gusano de seda). Una variedad de cepas para transfección se encuentra públicamente disponible, p. ej., la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus se pueden usar, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco también pueden emplearse como hospedantes.

En otro aspecto, la expresión de anti-CD40 humanizado se lleva a cabo en células de vertebrados. La propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejido) se ha convertido en un procedimiento de rutina, y las técnicas se encuentran muy disponibles. Los ejemplos de líneas celulares hospedantes de mamíferos útiles son la línea de riñón de mono CV1 transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, (Graham et al., 1977, *J. Gen Virol.* 36: 59), células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10), células de ovario de hámster chino/-DHFR1 (CHO, Urlaub et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216; p. ej., DG44), células sertoli de ratón (TM4, Mather, 1980, *Biol. Reprod.* 23:243-251), células renales de mono (CV1 ATCC CCL 70), células renales del mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587), células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2), células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34), células hepáticas de rata y búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442), células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75), células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065), células de tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51), células TR1 (Mather et al., 1982, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44-68), células MRC 5, células FS4 y línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células hospedantes se transforman con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritos para producción del anticuerpo anti-CD40 humanizado y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o ampliar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Las células hospedantes utilizadas para producir un anticuerpo anti-CD40 humanizado descritas en la presente memoria se pueden cultivar en una diversidad de medios. Los medios comercialmente disponibles, tales como Ham's F10 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo.), Medio Esencial Mínimo (Minimal Essential Medium o MEM), (Sigma-Aldrich Co.), RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Co.) y Medio Eagle Modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium o DMEM), Sigma-Aldrich Co.) son adecuados para cultivar las células hospedantes. Además, cualquiera de los medios descritos en uno o más de Ham et al., 1979, Meth. Enz. 58: 44, Barnes et al., 1980, Anal. Biochem. 102: 255, patentes estadounidenses No. 4.767.704, No. 4.657.866, No. 4.927.762, No. 4.560.655, No. 5.122.469, documentos WO 90/103430 y WO 87/00195 se pueden utilizar como medios de cultivo para las células hospedantes. Cualquiera de estos medios puede enriquecerse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (como cloruro de sodio, calcio, magnesio y potasio), tampones (como HEPES), nucleótidos (como adenosina y timidina), antibióticos (como gentamicina), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos usualmente presentes en concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Pueden incluirse también otros complementos necesarios en concentraciones adecuadas que sean conocidos por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, como de temperatura, pH y similares, son aquellas previamente empleadas con la célula hospedante seleccionada, y serán obvias para el experto en la materia.

Cuando se usen técnicas recombinantes, el anticuerpo podrá producirse de manera intracelular, en el espacio periplásmico, o segregarse directamente en el medio. Si el anticuerpo es producido de manera intracelular, las células pueden romperse para liberar proteína como una primera etapa. Los restos de partículas, ya sean células huésped o fragmentos lisados, pueden eliminarse, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., 1992, Bio/Technology 10:163-167 describe un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, se congela pasta celular en presencia de acetato sódico (pH 3.5), EDTA y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) durante aproximadamente 30 minutos. Los sedimentos celulares se eliminan por centrifugación. Si el anticuerpo se segrega en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión en general se concentran primero usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas previas para inhibir la proteólisis, y se pueden incluir antibióticos para prevenir el desarrollo de contaminantes fortuitos. Se puede emplear una diversidad de métodos para aislar el anticuerpo de la célula hospedante.

La composición del anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad una técnica de purificación típica. La adaptabilidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A se puede utilizar para purificar anticuerpos que se basen en cadenas pesadas humanas gamma1, gamma2 o gamma4 (véase, p. ej., Lindmark et al., 1983 J. Immunol. Meth. 62:1-13). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para gamma3 humana (véase, p. ej., Guss et al., 1986 EMBO J. 5:1567-1575). Una matriz a la que está unida un ligando de afinidad es por lo general agarosa, pero existen otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno, permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que la agarosa. Si el anticuerpo comprende un dominio CH₃, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para purificación. Otras técnicas para purificación de proteínas, como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación de etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (como columna de ácido poliaspártico), cromatofoco, SDS-PAGE y precipitación de sulfato de amonio, están también disponibles, dependiendo del anticuerpo que se ha de recuperar.

Después de cualquier etapa(s) de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes se puede someter a cromatografía de interacción hidrófoba de bajo pH usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, típicamente a bajas concentraciones salinas (p. ej., aproximadamente 0-0,25M de sal).

Se describen en este documento también ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones de baja, moderada y alta rigurosidad, tal como se define en la presente memoria, a todas o una porción (por ejemplo, la porción que codifica la región variable) de la secuencia de nucleótidos representada por la(s) secuencia(s) de polinucleótidos aislada(s) que codifica(n) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 26, respectivamente; SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:26, respectivamente; SEQ ID NO:29 y SEQ ID NO:26, respectivamente; SEQ ID NO:30 y SEQ ID NO:26, respectivamente; SEQ ID NO:32 y SEQ ID NO:31, respectivamente; SEQ ID NO:33 y SEQ ID NO:31, respectivamente; SEQ ID NO:34 y SEQ ID NO:31, respectivamente; SEQ ID NO:35 y SEQ ID NO:31, respectivamente; SEQ ID NO:37 y SEQ ID NO:36, respectivamente; SEQ ID NO:38 y SEQ ID NO:36, respectivamente; SEQ ID NO:39 y SEQ ID NO:36, respectivamente; SEQ ID NO:40 y SEQ ID NO: 36, respectivamente. La porción hibridante del ácido nucleico hibridante tiene típicamente por lo menos 15 (p. ej., 20, 25, 30 o 50) nucleótidos de longitud. La porción hibridante del ácido nucleico hibridante es por lo menos 80%, p. ej., por lo menos 90%, por lo menos 95% o por lo menos 98%, idéntica a la secuencia de una porción o todo el ácido nucleico que codifica un polipéptido anti-CD40 (p. ej., una región variable de cadena pesada o de cadena ligera), o su complemento. Los ácidos nucleicos hibridantes del tipo

descrito en la presente invención se pueden utilizar, por ejemplo, como una sonda de clonación, un cebador, p. ej., un cebador PCR, o una sonda de diagnóstico.

También se describen en este documento polinucleótidos aislados que incluyen secuencias que codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada que es al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 4, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39 o SEQ ID NO: 40. También se describen en la presente polinucleótidos aislados que incluyen secuencias que codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera que es al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 5 a 8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:31 o SEQ ID NO: 36.

La secuencia(s) polinucleotídica(s) aislada(s) descrita(s) en este documento codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, cada uno de los cuales incluye una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% , al menos 98% o al menos 99% a la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO : 26, respectivamente; SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 26, respectivamente; SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 26, respectivamente; SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 26, respectivamente; SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 31, respectivamente; SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 31, respectivamente; SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 31, respectivamente; SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 31, respectivamente; SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 36, respectivamente; SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 36, respectivamente; SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 36, respectivamente SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 36, respectivamente.

También se describe en este documento un polinucleótido descrito inmediatamente antes, en el que el dominio variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo o fragmento de anticuerpo codificado incluye una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% a la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de, en una realización, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 26, respectivamente; SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 26, respectivamente; SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 26, respectivamente; SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 26, respectivamente; SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 31, respectivamente; SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 31, respectivamente; SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 31, respectivamente; SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 31, respectivamente; SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 36, respectivamente; SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 36, respectivamente; SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 36, respectivamente; y SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 36, respectivamente.

Tal como se emplean en esta memoria, las expresiones "idéntico/a" o "porcentaje de identidad," en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen el mismo porcentaje especificado de nucleótidos o residuos de aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para correspondencia máxima. Para determinar el porcentaje de identidad, las secuencias se alinean para fines de comparación óptima (p. ej., se pueden introducir espacios en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o ácido nucleico para alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o ácido nucleico). Se comparan luego los residuos de aminoácidos o los nucleótidos en las correspondientes posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos. Cuando una posición en la primera secuencia es ocupada por el residuo de aminoácidos o el nucleótido como la correspondiente posición en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % identidad=Núm. de posiciones idénticas/Núm. total de posiciones (p. ej., posiciones superpuestas)x100). En algunas realizaciones, las dos secuencias que se comparan tienen la misma longitud después de que se han introducido espacios dentro de las secuencias, según corresponda (p. ej., excluyendo la secuencia adicional que se extiende más allá de las secuencias que se están comparando). Por ejemplo, cuando se comparan secuencias de región variable, las secuencias de dominio inicial y/o constante no se consideran. Para comparaciones de secuencias entre dos secuencias, una CDR "correspondiente" se refiere a una CDR en la misma ubicación en ambas secuencias (p. ej., CDR-H1 de cada secuencia).

La determinación del porcentaje de identidad o porcentaje de similitud entre dos secuencias puede realizarse usando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido y no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, modificado como en Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Dicho algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST, puntaje=100, longitud de palabra=12, para obtener las secuencias de nucleótidos homólogas a un ácido nucleico que codifica una proteína de interés. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntaje=50, longitud de palabra=3, para obtener las secuencias de aminoácidos homólogas a la proteína de interés. Para obtener alineaciones espaciadas para fines comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res.

25:3389-3402. Alternativamente, se puede usar PSI-Blast para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas (Id.). Cuando se usan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, se pueden utilizar los parámetros por defecto de los respectivos programas (p. ej., XBLAST y NBLAST). Otro ejemplo preferido y no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). Dicho algoritmo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software para alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede utilizar una tabla de residuos de peso PAM120, una penalidad de longitud de espacio de 12 y una penalidad de espacio de 4. Se conocen en la técnica algoritmos adicionales para análisis de secuencias e incluyen ADVANCE y ADAM como se describe en Torellis and Robotti, 1994, *Comput. Appl. Biosci.* 10:3-5; y FASTA descrito en Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-8. Dentro de FASTA, ktup es una opción de control que establece la sensibilidad y velocidad de la búsqueda. Si ktup=2, se encuentran regiones similares en las dos secuencias que se están comparando buscando pares de residuos alineados; si ktup=1, se examinan aminoácidos alineados individuales. ktup puede regularse en 2 o 1 para secuencias de proteínas, entre 1 y 6 para secuencias de DNA. Si no se especifica ktup por defecto, éste es 2 para proteínas y 6 para DNA. Alternativamente, la alineación de la secuencia proteica puede llevarse a cabo usando el algoritmo CLUSTAL W, como se describe por Higgins et al., 1996, *Methods Enzymol.* 266:383-402.

Usos no terapéuticos

Los anticuerpos descritos en esta invención son útiles como agentes de purificación de afinidad. En este proceso, los anticuerpos se inmovilizan en una fase sólida tal como una resina de Proteína A, usando métodos conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene la proteína CD40 (o su fragmento) a purificar, y luego se lava el soporte con un disolvente adecuado que eliminará prácticamente todo el material en la muestra, excepto la proteína CD40, que está unida al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado que liberará la proteína CD40 del anticuerpo.

Los anticuerpos anti-CD40 humanizados son también útiles en ensayos diagnósticos para detectar y/o cuantificar la proteína CD40, por ejemplo, detectar la expresión de CD40 en células, tejidos o sueros específicos.

Será ventajoso en algunas realizaciones, por ejemplo, para fines diagnósticos, marcar el anticuerpo con un resto detectable. Existen numerosas etiquetas detectables, incluyendo radioisótopos, etiquetas fluorescentes, etiquetas de sustratos de enzimas y similares. La etiqueta puede conjugarse indirectamente con el anticuerpo, usando diversas técnicas conocidas. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina y cualquiera de las tres amplias categorías de etiquetas mencionadas anteriormente puede conjugarse con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a la avidina y, por lo tanto, la etiqueta puede conjugarse con el anticuerpo en este modo indirecto. Alternativamente, para lograr la conjugación indirecta de la etiqueta con el anticuerpo, el anticuerpo puede conjugarse con un pequeño hapteno (como digoxina), y uno de los diferentes tipos de etiquetas ya mencionados se conjuga con un anticuerpo anti-hapteno (p. ej., anticuerpo anti-digoxina). Por lo tanto, se puede lograr la conjugación indirecta de la etiqueta con el anticuerpo.

Las etiquetas de radioisótopos ilustrativas incluyen ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I . El anticuerpo puede marcarse con el radioisótopo, usando las técnicas descritas en, por ejemplo, *Current Protocols in Immunology*, Volúmenes 1 y 2, 1991, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. La radiactividad se puede medir, por ejemplo, mediante conteo de centelleo.

Están disponibles las etiquetas fluorescentes ilustrativas derivadas de quelatos térreos raros (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, Lissamina, fitycoeritrina y Texas Rojo. Las etiquetas fluorescentes se pueden conjugar al anticuerpo mediante técnicas conocidas, como aquellas descritas en *Current Protocols in Immunology*, supra, por ejemplo. La fluorescencia puede cuantificarse usando un fluorímetro.

Se conocen en la técnicas diversos marcadores enzima-sustrato bien caracterizados (véase, p. ej., la patente estadounidense No. 4.275.149 para revisión). La enzima en general cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que puede medirse usando diversas técnicas. Por ejemplo, la alteración puede ser un cambio de color en un sustrato que puede medirse de manera espectrofotométrica. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimiluminiscencia del sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio en fluorescencia se han descrito anteriormente en la presente invención. El sustrato quimiluminiscente se excita electrónicamente mediante una reacción química y puede luego emitir luz que puede medirse, usando un quimiluminómetro, por ejemplo, o dona energía a un aceptor fluorescente.

Los ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas tales como luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente estadounidense No. 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (como glucosa oxidasas, galactosa oxidasas y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocídicas (como uricasa y xantina oxidasas), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Las técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos se describen, por ejemplo, en O'Sullivan et al., 1981, *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, en *Methods in Enzym.* (J. Langone & H. Van Vunakis, eds.), Academic press, N.Y., 73: 147-166.

5 Los ejemplos de combinaciones enzima-sustrato incluyen, por ejemplo: Peroxidasa de rábano picante (HRPO) con peroxidasa de hidrógeno como sustrato, donde la peroxidasa de hidrógeno oxida el precursor de tinte tal como ortofenileno diamina (OPD) o hidrocloreuro de 3,3',5,5'-tetrametil benzidina (TMB); fosfatasa alcalina (AP) con para-Nitrofenil fosfato como sustrato cromogénico; y β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico tal como p-nitrofenil- β -D-galactosidasa o sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidasa.

Existen muchas otras combinaciones de enzima-sustrato disponibles para los expertos en la técnica. Para una revisión general de estos, véase la patente de EE.UU. No. 4.275.149 y la patente de EE.UU. No. 4.318.980.

En otra realización, el anticuerpo anti-CD40 humanizado se usa sin marcar y detectarse con un anticuerpo marcado que se une al anticuerpo anti-CD40 humanizado.

10 Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden emplearse en cualquier método de ensayo conocido, como ensayos de unión competitiva, ensayos sándwich directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación. Véase, p. ej., Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

Kits de diagnóstico

15 Un anticuerpo anti-CD40 humanizado se puede utilizar en un kit de diagnóstico, es decir, una combinaciones envasada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar el ensayo diagnóstico. Si el anticuerpo está etiquetado con una enzima, el kit puede incluir sustratos y cofactores requeridos por la enzima, tal como un precursor de sustrato que provee un cromóforo o fluoróforo detectable. Además, se pueden incluir otros aditivos como estabilizantes, tampones (por ejemplo un tampón en bloque o tampón de lisis), y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variar en gran medida para proveer concentraciones en
20 solución de los reactivos que optimicen sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Los reactivos pueden ser provistos como polvos secos, usualmente liofilizados, incluyendo excipientes que en disolución proveen una solución de reactivo que tiene la concentración apropiada.

Usos terapéuticos

25 En otra realización, un anticuerpo anti-CD40 humanizado descrito en esta memoria es útil en el tratamiento de diversos trastornos asociados con la expresión de CD40, como se describe en esta memoria.

30 El agente o anticuerpo anti-CD40 humanizado es para administrarse por medios adecuados, incluyendo la administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, si se desea el tratamiento inmunosupresor local, administración intralesional (lo que incluye perfundir o poner en contacto el injerto con el anticuerpo antes del trasplante). El agente o anticuerpo anti-CD40 humanizado puede administrarse, por ejemplo, como una infusión o un bolo. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el anticuerpo anti-CD40 humanizado se administra adecuadamente por infusión de pulsos, particularmente con dosis en descenso del anticuerpo. En un aspecto, la dosis se administra por inyecciones, más preferiblemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

35 Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosificación apropiada de anticuerpo dependerá de una diversidad de factores, como el tipo de enfermedad a ser tratada, como se definió anteriormente, de la gravedad y del curso de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, de la historia clínica del paciente y de la respuesta al anticuerpo, y de la discreción del médico que atiende. El anticuerpo se administra convenientemente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

40 Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 μ g/kg a 20 mg/kg (por ejemplo, 0,1-15 mg/kg) de anticuerpo es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, por una o más administraciones separadas, o por infusión continua. Una dosificación diaria típica puede oscilar entre aproximadamente 1 μ g/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se sostiene
45 hasta que se produzca la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales. Un régimen de dosificación ilustrativo es aquel descrito en el documento WO 94/04188.

El término "supresión" se usa en este documento en el mismo contexto que "mejora" y "alivio" para indicar una disminución de una o más características de la enfermedad.

50 La composición del anticuerpo se formulará, dosificará y administrará en un modo coherente con las buenas prácticas médicas. Los factores para consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se esté tratando, el mamífero particular que se esté tratando, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el esquema de administración y otros factores conocidos por los médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del anticuerpo que se ha de administrar será
55 regida por dichas consideraciones y será la cantidad necesaria mínima para prevenir, aliviar o tratar el trastorno asociado con la expresión de CD40.

El anticuerpo no necesita formularse, pero opcionalmente se formula, con uno o más agentes actualmente utilizados para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo anti-CD40 humanizado presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores ya analizados. En general se utilizan en la misma dosis y con las rutas de administración utilizadas anteriormente en la presente invención o aproximadamente entre 1 y 99% de las dosis empleadas aquí.

Trastornos asociados a CD40

Los agentes o anticuerpos anti-CD40 son útiles para tratar o prevenir un tumor maligno que expresa CD40 o un trastorno inmunológico caracterizado por la expresión de CD40, p. ej., por activación inapropiada de células inmunitarias (p. ej., linfocitos o células dendríticas). Dicha expresión de CD40 puede deberse, por ejemplo, a un aumento en los niveles de la proteína CD40 en la superficie de las células y/o antigenicidad alterada de la CD40 expresada. El tratamiento o la prevención del trastorno inmunológico, de acuerdo con los usos descritos en la presente invención, se logra administrando a un sujeto que necesita dicho tratamiento o prevención, una cantidad eficaz del agente o anticuerpo anti-CD40, donde el anticuerpo (i) se une a las células inmunitarias activadas que expresan CD40 y que se asocian con el estado de enfermedad, y (ii) ejerce un efecto citotóxico, citostático o inmunosupresor sobre las células inmunitarias activadas.

Las enfermedades inmunológicas que se caracterizan por activación inapropiada de células inmunitarias y que pueden tratarse o prevenirse con los métodos descritos en esta memoria pueden clasificarse, por ejemplo, por el tipo(s) de reacción o reacciones de hipersensibilidad subyacentes al trastorno. Estas reacciones típicamente se clasifican en cuatro tipos: reacciones anafilácticas, reacciones citotóxicas (citólíticas), reacciones complejas inmunitarias o reacciones de inmunidad mediada por células (CMI) (también denominadas reacciones de hipersensibilidad de tipo demorado (DTH)). (Véase, p. ej., *Fundamental Immunology* (William E. Paul ed., Raven Press, N.Y., 3rd ed. 1993).)

Los ejemplos específicos de dichas enfermedades inmunológicas incluyen las siguientes: artritis reumatoide, enfermedades desmielinantes autoinmunitarias (p. ej., esclerosis múltiple, encefalomiелitis alérgica), oftalmopatía endocrina, uveorretinitis, lupus eritematoso sistémico, miastenia grave, enfermedad de Grave, glomerulonefritis, trastorno hepatológico autoinmunitario, enfermedad intestinal inflamatoria (p. ej., enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa), anafilaxia, reacción alérgica, síndrome de Sjogren, diabetes mellitus de tipo I, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, fibromialgia, polimiositis, dermatomiositis, miositis inflamatoria, falla endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, uveítis autoinmunitaria, enfermedad de Addison, adrenalitis, tiroiditis, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, anemia perniciosa, atrofia gástrica, hepatitis crónica, hepatitis lúpica, aterosclerosis, lupus eritematoso cutáneo subagudo, hipoparatiroidismo, síndrome de Dressler, trombocitopenia autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica, péñfigo vulgar, dermatitis herpetiforme, alopecia areata, penfigoide, esclerodermia, esclerosis sistémica progresiva, síndrome de CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), esterilidad autoinmunitaria masculina y femenina, espondilitis anquilosante, colitis ulcerosa, enfermedad del tejido conjuntivo mixto, poliarteritis nodosa, vasculitis necrosante sistémica, dermatitis atópica, rinitis atópica, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Chagas, sarcoidosis, fiebre reumática, asma, aborto recurrente, síndrome anti-fosfolipídico, pulmón del granjero, eritema multiforme, síndrome post-cardiotomía, síndrome de Cushing, hepatitis activa crónica autoinmunitaria, neumopatía de los avicultores, necrólisis epidérmica tóxica, síndrome de Alport, alveolitis, alveolitis alérgica, alveolitis fibrosante, enfermedad pulmonar intersticial, eritema nodoso, pioderma gangrenoso, reacción de transfusión, arteritis de Takayasu, polimialgia reumática, arteritis temporal, esquistosomiasis, arteritis de células gigantes, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, eczema, granulomatosis linfomatoide, enfermedad de Behcet, síndrome de Caplan, enfermedad de Kawasaki, dengue, encefalomiелitis, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, endoftalmitis, eritema elevatum et diutinum, psoriasis, eritroblastosis fetal, fascitis eosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, filariasis, ciclitis, ciclitis crónica, ciclitis de Fuch, nefropatía por IgA, púrpura de Henoch-Schonlein, enfermedad de injerto contra hospedante, rechazo a trasplante, cardiomiopatía, síndrome de Eaton-Lambert, policondritis recidivante, crioglobulinemia, macroglobulinemia de Waldenstrom, síndrome de Evan, síndrome de dificultad respiratoria, inflamación pulmonar, osteoporosis, hipersensibilidad del tipo demorada y falla gonadal autoinmunitaria.

Por consiguiente, los usos descritos en la presente memoria abarcan el tratamiento de trastornos de los linfocitos B (p. ej., lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, artritis reumatoide y diabetes de tipo I), de los linfocitos Th₁ (p. ej., artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, síndrome de Sjogren, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, tuberculosis o enfermedad injerto contra hospedante) o de los linfocitos Th₂ (p. ej., dermatitis atópica, lupus eritematoso sistémico, asma atópica, rinoconjuntivitis, rinitis alérgica, síndrome de Omenn, esclerosis sistémica o enfermedad de injerto contra hospedante crónica). En general, los trastornos que implican células dendríticas abarcan trastornos de los linfocitos Th₁ o Th₂.

La artritis reumatoide (RA) es una de las enfermedades autoinmunitarias inflamatorias más comunes que afecta a aproximadamente 1% de la población. Si bien existen tratamientos eficaces (p. ej., . MTX y agentes anti-TNF), existe una gran necesidad médica no satisfecha, especialmente para aquellos pacientes que no responden adecuadamente a las terapias anti-TNF (aproximadamente 30% de los pacientes). Además, hasta 50% de los pacientes discontinúan el tratamiento con antagonistas de TNF dentro de los 5 años, principalmente debido a los

eventos adversos, pero también porque un número cada vez mayor de pacientes pierde el beneficio terapéutico. Por lo tanto, es importante establecer terapias eficaces que se dirijan a la inflamación y a la destrucción articular en RA pero que no dependan exclusivamente de la inhibición directa de TNF. Un planteamiento muy atractivo consiste en dirigir las vías celulares coestimuladoras. Uno de los pares receptor-ligando claves en la coestimulación es CD40/CD40L. Este sistema permite interacciones entre células inmunitarias y entre células inmunitarias y no inmunitarias, las cuales son todas importantes en la patogénesis de la RA. El bloqueo de CD40 con un anticuerpo antagonista de la presente invención puede tener uno o más de los siguientes efectos en RA:

1) Inhibir la diferenciación de células B y el cambio de isotipo del anticuerpo;

2) Inhibir la producción de citocinas y quimiocinas y el aumento de moléculas de adhesión en células T y macrófagos;

3) Inhibir la activación de células dendríticas; e

4) Inhibir la producción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, metaloproteinasas de matriz, prostaglandina, y reducir las moléculas de adhesión en células no inmunitarias (p. ej., células epiteliales, endoteliales y mesenquimales).

Los usos terapéuticos que logran uno o más de los efectos anteriores se contemplan expresamente en este documento. Además de RA, las composiciones de la presente invención serán particularmente útiles en el tratamiento de la esclerosis múltiple, la psoriasis (incluida la artritis psoriásica), la artritis reumatoide juvenil, enfermedad inflamatoria intestinal, lupus eritematoso sistémico y trasplante de órgano sólido.

La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad autoinmunitaria crónica y sistémica con una prevalencia de aproximadamente 1% en adultos. La enfermedad sigue causando una importante morbilidad y mortalidad prematura (la mortalidad se debe predominantemente a enfermedad cardiovascular acelerada). Se ha identificado que el daño articular ocurre muy temprano en el curso de la enfermedad, donde hasta 30% de los pacientes exhiben datos radiográficos de erosiones óseas al momento del diagnóstico, aumentando hasta 60% después del primer año. Las pautas actuales recomiendan iniciar la terapia con fármacos antirreumáticos tradicionales modificadores de la enfermedad (DMARD) dentro de los 3 meses de haber establecido un diagnóstico definitivo. Las DMARD tienen el potencial de reducir o prevenir el daño articular y conservar la función articular. Actualmente, los reumatólogos seleccionan el metotrexato (MTX) como la terapia DMARD inicial para la mayoría de los pacientes.

Los antagonistas de TNF etanercept (Enbrel®), infliximab (Remicade®), adalimumab (Humira®), el antagonista de CTLA4 abatacept (Orencia®), el receptor anti-IL-6 mAb tocilizumab y el anti-CD20 mAb rituximab (Rituxan®) son eficaces en el tratamiento de RA. Las pautas actuales en general recomiendan usar DMARD biológicas para el tratamiento de RA activa después de una respuesta inadecuada a las DMARD tradicionales.

Estudios recientes en pacientes con RA progresiva temprana sin tratamiento previo con MTX demostraron que la combinación de MTX con un antagonista de TNF fue superior a cada uno de ellos utilizados como monoterapia. El resultado más asombroso fue el significativo beneficio radiológico de la terapia combinada. Por lo tanto, la combinación de MTX e inhibidores de TNF debería usarse en pacientes con el mayor riesgo de enfermedad agresiva y fenotipo agresivo (p. ej., alto puntaje de actividad, debilitación funcional, seropositividad para el factor reumatoide (RF) o anticuerpo peptídico citrulinado (CCP), CRP elevado, erosiones radiográficas). Sin embargo, anticipamos que en la práctica clínica sería extraño que los antagonistas de TNF se usaran como terapia de primera línea. Un estudio de reumatólogos estadounidenses realizado en abril de 2005 demostró que los factores que más influenciaban la decisión de usar un antagonista de TNF eran: el fracaso de MTX o múltiples terapias DMARD, evaluación global médica, debilitamiento funcional y empeoramiento radiográfico o erosiones. Actualmente, se estima que 20% de los pacientes con RA reciben terapia inhibidora de TNF en los Estados Unidos.

Un porcentaje sustancial de pacientes que padecen RA no recibe alivio adecuado con los tratamientos actuales, incluyendo las terapias biológicas, o bien debido a la intolerancia a los fármacos y la toxicidad, o por falta de respuesta. Hasta 50% de los pacientes discontinúan el tratamiento con antagonistas de TNF dentro de los 5 años, principalmente debido a los eventos adversos, pero también porque un número cada vez mayor de pacientes pierde su respuesta.

En algunas realizaciones, el trastorno inmunológico es un trastorno inmunológico mediado por células T, como un trastorno de células T en el que las células T activadas se asocian con el trastorno que expresa CD40. Los agentes o anticuerpos anti-CD40 se pueden administrar para reducir dichas células T activadas que expresan CD40. En una realización específica, la administración de agentes o anticuerpos anti-CD40 puede reducir las células T activadas que expresan CD40, mientras que las células T en reposo no son sustancialmente reducidas por el agente o anticuerpo anti-CD40. En este contexto, "no sustancialmente reducidas" significa que menos de aproximadamente 60%, o menos de aproximadamente 70% o menos de aproximadamente 80% de las células T en reposo no disminuyen.

Los agentes o anticuerpos anti-CD40 descritos en la presente invención también son útiles para tratar o prevenir un tumor maligno que expresa CD40. El tratamiento o la prevención de un tumor maligno que expresa CD40, de

acuerdo con los usos descritos en la presente invención, se logra administrando a un sujeto que necesita dicho tratamiento o prevención, una cantidad eficaz del agente o anticuerpo anti-CD40, donde el agente o anticuerpo (i) se une a las células que expresan CD40, y (ii) ejerce un efecto citotóxico o citostático para reducir o inhibir la proliferación de células cancerosas que expresan CD40.

5 Los cánceres que expresan CD40 que pueden tratarse o prevenirse usando el anticuerpo de la invención incluyen, por ejemplo, leucemia, tal como leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda (por ejemplo, mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica o eritroleucemia), leucemia crónica, leucemia mielocítica crónica (granulocítica) o leucemia linfocítica crónica; policitemia vera; linfoma (p. ej., enfermedad de Hodgkin o enfermedad no Hodgkin); mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom; enfermedad de cadena pesada; tumores sólidos tales como sarcomas y carcinomas (p. ej., fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, osteosarcoma, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomyosarcoma, carcinoma de colon, carcinoma colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del ducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, cáncer uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, carcinoma nasofaríngeo o carcinoma esofágico).

Composiciones farmacéuticas y su administración

25 Una composición que comprende un anticuerpo anti-CD40 se puede administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno inmunológico o un cáncer que expresa CD40. La invención proporciona además el uso de un anticuerpo anti-CD40 en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un cáncer que expresa CD40 o un trastorno inmunológico. El término "sujeto" como se usa en la presente memoria significa cualquier paciente mamífero al que se puede administrar un agente de unión a CD40, que incluye, por ejemplo, mamíferos humanos y no humanos, tales como primates, roedores y perros. Los sujetos específicamente destinados para el tratamiento que emplea los métodos descritos en la presente invención incluyen seres humanos. Los anticuerpos se pueden administrar solos o en combinación con otras composiciones en la prevención o el tratamiento del trastorno inmunológico o cáncer que expresa CD40.

35 Los anticuerpos preferidos para uso en tales composiciones farmacéuticas son aquellos que comprenden anticuerpos humanizados que tienen la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de cualquiera de SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33 o SEQ ID NO:35.

40 Algunas realizaciones incluyen polinucleótidos aislados que comprenden secuencias que codifican un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO:31. Las composiciones de anticuerpos humanizados particularmente preferidas comprenden un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:32 y SEQ ID NO:31, respectivamente, SEQ ID NO:33 y SEQ ID NO:31, respectivamente, SEQ ID NO:35 y SEQ ID NO:31, respectivamente. En la presente invención se contemplan polinucleótidos aislados que codifican cualquiera de las secuencias de cadena pesada de SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33 o SEQ ID NO:35. Otras realizaciones están dirigidas a ácidos nucleicos aislados que codifican una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 31.

45 En ciertas realizaciones, cuando se contempla el tratamiento de RA, las composiciones de la invención pueden usarse para reducir signos y síntomas, inducir una respuesta clínica importante y reducir la progresión del daño estructural en pacientes con AR activa de moderada a grave que no responden adecuadamente al MTX solo. Un ejemplo actual de dicha terapia es: Enbrel/Humira (Los datos con Humira y Enbrel se obtuvieron en dos poblaciones de pacientes distintas). Las composiciones de la presente invención se pueden utilizar en lugar de una terapia de Enbrel/Humira o en combinación con terapia de Enbrel/Humira para sujetos que no responden a MTX solo. Preferiblemente, en dichas realizaciones, las composiciones de la invención tendrán una eficacia superior a Enbrel +MTX en pacientes que han tenido una respuesta inadecuada al metotrexato, según lo determinado por ejemplo por: ACR20 a 6 meses >85% para el compuesto más MTX (GS: Enbrel +MTX 71% vs. Placebo + MTX 27%, Humira + MTX a 12 meses 59% vs. Placebo + MTX 24%)*. Otros criterios de eficacia superior de las composiciones de la invención pueden incluir: Inhibición de progresión de daño estructural en un período de un año similar a Enbrel (después de 52 semanas con un puntaje de Sharp modificado medio Humira + MTX 0,1 vs. Placebo + MTX 2,7)*. En otras realizaciones más, las composiciones producen una "Respuesta Clínica Mayor" superior a Enbrel en pacientes que han tenido una respuesta inadecuada al metotrexato según lo medido por ACR70 (20% para Humira + MTX, 4% para Placebo + MTX)*.

En otras realizaciones, las composiciones de la invención se pueden indicar para reducir signos y síntomas, induciendo una respuesta clínica importante y reduciendo la progresión de daño estructural en pacientes con RA moderada a severamente activa que han tenido una respuesta inadecuada a los agentes anti-TNF. El mejor tratamiento disponible actualmente: terapia biológica no anti-TNF. Preferiblemente, en dichos sujetos las composiciones de la invención poseen una eficacia no inferior en comparación con la terapia biológica no anti-TNF (p. ej., Orencia, Rituxan) por comparación histórica en pacientes que han tenido una respuesta inadecuada a un agente anti-TNF: ACR20 a 6 meses >50% para el compuesto más DMARD (GS: Orencia + DMARD 50% vs. placebo + DMARD 20%). Incluso en otras realizaciones, las composiciones de la invención inhiben la progresión del daño estructural en un periodo de un año evaluada por métodos de puntaje de rayos X aceptados para erosión articular y angostamiento del espacio articular, similar a Rituxan (después de 52 semanas con un puntaje de Sharp modificado medio + MTX 1,0 vs. Placebo + MTX 2,31).

Se conocen diversos sistemas de administración y se pueden usar para administrar el agente de unión a CD40. Los métodos de introducción incluyen, aunque sin limitarse a ello, las rutas intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. El agente de unión a CD40 se puede administrar, por ejemplo, por infusión, bolo o inyección, y se puede administrar junto con otros agentes biológicamente activos tales como agentes quimioterapéuticos. La administración puede ser sistémica o local. En realizaciones preferidas, la administración es por inyección subcutánea. Las formulaciones tales como las inyecciones se pueden preparar, por ejemplo, en jeringas prellenadas que pueden administrarse una vez cada quince días.

Las características de seguridad de los anticuerpos de la invención se determinarán y preferiblemente incluirán más patrones tales como: interacciones adversas clínicamente no significativas con otros medicamentos comúnmente utilizados para tratar artritis reumatoide (p. ej., DMARD, esteroides, AINE,); Una tasa de discontinuidad no mayor debida a cuestiones de tolerabilidad que Enbrel; tasa de infecciones graves no mayor que aquella de los agentes anti-TNF u otros agentes biológicos comúnmente utilizados; Frecuencia y/o gravedad de reacciones en el sitio de inyección o reacción de infusión similar a Enbrel; Desarrollo mínimo o ninguno de resistencia a los fármacos (menos de 5%) tres ciclos repetidos de terapia; Ninguno o muy pocos anticuerpos neutralizantes; Ningún signo de aumento de agregación/activación plaquetaria que podría conducir a eventos tromboembólicos in vivo o disfunción plaquetaria/endotelial que podría conducir a hemorragia.

En realizaciones específicas, la composición de anticuerpo anti-CD40 humanizado es para administrarse mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo el implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo una membrana, tal como una membrana sialástica o una fibra. Típicamente, cuando se administra la composición, se utilizan materiales que el agente o anticuerpo anti-CD40 no absorbe.

En otras realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 se administra en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede usar una bomba (véase, por ejemplo, Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Sefton, 1989, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). En otra realización, se pueden utilizar materiales poliméricos. (Véase, por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release (Langer y Wise eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance (Smolen y Ball eds., Wiley, New York, 1984); Ranger y Peppas, 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61. Véase también Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105.) Otros sistemas de liberación controlada se analizan, por ejemplo, en Langer, supra.

Un agente de unión a CD40 (p. ej., un anticuerpo anti-CD40) se puede administrar como composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del agente de unión y uno o más ingredientes farmacéuticamente compatibles.

En realizaciones típicas, la composición farmacéutica se formula de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa o subcutánea a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración por inyección son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Si es necesario, la composición farmacéutica puede también incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. En general, los ingredientes se proveen o bien separadamente o juntos en la forma de dosificación, por ejemplo, como un polvo liofilizado o concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o saché que indica la cantidad de agente activo. Si la composición farmacéutica se ha de administrar por infusión, se puede dispensar con un frasco de infusión que contiene la formulación farmacéutica estéril acuosa o en solución salina. Si la composición farmacéutica se administra por inyección, se puede proveer una ampolla o solución salina de modo que los ingredientes se mezclen antes de la administración.

Además, la composición farmacéutica se puede proveer como un kit que comprende (a) un envase que contiene un agente de unión a CD40 (p. ej., un anticuerpo anti-CD40) en forma liofilizada y (b) un segundo envase que contiene un diluyente farmacéuticamente aceptable (p. ej., estéril) para inyección. El diluyente farmacéuticamente aceptable se puede utilizar para reconstitución o dilución del agente o anticuerpo anti-CD40 liofilizado. Opcionalmente asociado a dicho envase(s) puede haber un aviso en la forma prescrita por un agencia gubernamental que regula la

elaboración, uso o venta de productos farmacéuticos o productos biológicos, que refleja la aprobación de la elaboración, uso o venta para administración humana por parte de la agencia.

La cantidad del agente(s) de unión a CD40 (p. ej., un anticuerpo anti-CD40) que es eficaz en el tratamiento o la prevención de un trastorno inmunológico o un tumor maligno que expresa CD40 se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales. Además, opcionalmente pueden emplearse ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que se empleará en la formulación dependerá también de la ruta de administración, y de la etapa del trastorno inmunológico o cáncer que expresa CD40, y deberá decidirse según el criterio del médico y de las circunstancias particulares del paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de dosis y respuesta derivadas de sistemas de ensayo de modelos animales o *in vitro*.

Por ejemplo, la toxicidad y la eficacia terapéutica del agente o anticuerpo anti-CD40 puede determinarse en cultivos celulares o animales experimentales mediante procedimientos farmacéuticos convencionales para determinar la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en 50% de la población). Se prefiere un agente de unión a CD40 (p. ej., un anticuerpo anti-CD40) que exhibe un gran índice terapéutico. Si un agente de unión a CD40 exhibe efectos colaterales tóxicos, se puede utilizar un sistema de administración que dirija al agente de unión a CD40 hacia el sitio del tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células que no expresan CD40 y reducir así los efectos colaterales.

Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden utilizar para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosis del agente de unión a CD40 típicamente yace dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo, dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. Para cualquier agente de unión a CD40 utilizado en el método, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma circulante que incluya la CI₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logre una inhibición media máxima de los síntomas) según lo determinado en el cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar más precisamente una dosis útil en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento, ELISA y similares.

En general, la dosis de un anticuerpo anti-CD40 o agente de unión a CD40 administrada a un paciente con un trastorno inmunológico o cáncer que expresa CD40 es típicamente aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg del peso corporal del sujeto. La dosis administrada a un sujeto es aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg o aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del sujeto.

Las dosis ilustrativas incluyen, aunque sin limitarse a ello, entre 1 ng/kg y 100 mg/kg. En algunas realizaciones, una dosis es de aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 11 mg/kg, aproximadamente 12 mg/kg, aproximadamente 13 mg/kg, aproximadamente 14 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg o aproximadamente 16 mg/kg. La dosis se puede administrar, por ejemplo, una vez por semana (semanalmente), dos veces por semana, tres veces por semana, cuatro veces por semana, cinco veces por semana, seis veces por semana, quincenalmente o mensualmente, cada dos meses o cada tres meses. En realizaciones específicas, la dosis es de aproximadamente 0,5 mg/kg por semana, aproximadamente 1 mg/kg por semana, aproximadamente 2 mg/kg por semana, aproximadamente 3 mg/kg por semana, aproximadamente 4 mg/kg por semana, aproximadamente 5 mg/kg por semana, aproximadamente 6 mg/kg por semana, aproximadamente 7 mg/kg por semana, aproximadamente 8 mg/kg por semana, aproximadamente 9 mg/kg por semana, aproximadamente 10 mg/kg por semana, aproximadamente 11 mg/kg por semana, aproximadamente 12 mg/kg por semana, aproximadamente 13 mg/kg por semana, aproximadamente 14 mg/kg por semana, aproximadamente 15 mg/kg por semana o aproximadamente 16 mg/kg por semana. En algunas realizaciones, las dosis oscilan entre aproximadamente 1 mg/kg/ y aproximadamente 15 mg/kg/semana.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo anti-CD40 humanizado pueden comprender además un agente terapéutico, conjugado o no conjugado con el anticuerpo. El anticuerpo anti-CD40 puede coadministrarse en combinación con uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento o prevención de trastornos inmunológicos o cánceres que expresan CD40. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un agente citostático, citotóxico o inmunosupresor. La terapia de combinación también puede incluir, por ejemplo, la administración de un agente que direcciona un receptor o complejo de receptores distinto de CD40 en la superficie de los linfocitos activados, las células dendríticas o las células cancerosas que expresan CD40. Un ejemplo de dicho agente incluye un segundo anticuerpo no CD40 que se une a una molécula en la superficie de un linfocito activado, célula dendrítica o célula cancerosa que expresa CD40. Otro ejemplo incluye un ligando que se une a dicho receptor o complejo de receptores. Típicamente, dicho anticuerpo o ligando se une a un receptor de superficie celular en los linfocitos activados, la célula dendrítica o la célula cancerosa que expresa CD40 y potencia el efecto citostático o

citotóxico del anticuerpo anti-CD40 enviando una señal citostática o citotóxica al linfocito activado, célula dendrítica o célula cancerosa que expresa CD40.

La administración de dicha terapia combinada puede tener un efecto aditivo o sinérgico sobre los parámetros de la enfermedad (p. ej., intensidad de un síntoma, cantidad de síntomas o frecuencia de relapso).

5 Con respecto a los regímenes terapéuticos para la administración combinatoria, en una realización específica, se administra un anticuerpo anti-CD40 de forma concurrente con un agente terapéutico. En otra realización específica, el agente terapéutico se administra antes o después de la administración del anticuerpo anti-CD40, en al menos una hora y hasta varios meses, por ejemplo al menos una hora, cinco horas, 12 horas, un día, una semana, un mes o tres meses, antes o después de la administración del anticuerpo anti-CD40.

10 Las clases útiles de agentes citotóxicos o inmunosupresores incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, auristatinas (p. ej., MMAE o MMAF), agentes para ligandos de unión al surco menor de DNA, inhibidores de replicación de DNA, agentes alquilantes (p. ej., complejos de platino tales como cis-platino, mono(platino), bis(platino) y complejos de platino trinucleares y carboplatino), antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizantes de quimioterapia, duocarmicinas, etopósidos, pirimidinas fluoradas, ionóforos, lexitropsinas, nitrosoureas, platinoles, compuestos preformadores, antimetatabolitos de purina, puromicinas, sensibilizantes de radiación, esteroides, taxanos, inhibidores de topoisomerasa, vinca-alcaloides o similares.

15 Los agentes citotóxicos o inmunosupresores individuales incluyen, por ejemplo, un andrógeno, antramicina (AMC), asparaginasa, 5-azacitidina, azatioprina, bleomicina, busulfán, butionina sulfoximina, camptotecina, carboplatino, carmustina (BSNU), CC-1065, clorambucilo, cisplatino, colquicina, ciclofosfamida, citarabina, citidina arabinósido, citocalasina B, dacarbazina, dactinomicina (anteriormente actinomicina), daunorrubicina, decarbazina, docetaxel, doxorubicina, un estrógeno, 5-fluordesoxiuridina, 5-fluorouracilo, gramicidina D, hidroxurea, idarrubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina (CCNU), mecloretamina, melfalán, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitramicina, mitomicina C, mitoxantrona, nitroimidazol, paclitaxel, plicamicina, procarbizina, estreptozotocina, tenopósido, 6-tioguanina, tioTEPA, topotecán, vinblastina, vincristina, vinorelbina, VP-16 y VM-26.

20 En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un agente citotóxico. Los agentes citotóxicos adecuados incluyen, por ejemplo, dolastatinas (p. ej., auristatina E, AFP, MMAF, MMAE, AEB o AEVB), agentes para ligandos de unión al surco menor de DNA (p. ej., enediinas y lexitropsinas), duocarmicinas, taxanos (p. ej., paclitaxel y docetaxel), puromicinas, vinca-alcaloides, CC-1065, SN-38, topotecán, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, equinomicina, combretastatina, netropsina, epotilona A y B, estramustina, criptofisinas, cemadotin, maitansinoides, discodermólido, eleuterobina o mitoxantrona.

25 En algunas realizaciones, el agente citotóxico es un quimioterapéutico convencional, tal como doxorubicina, paclitaxel, melfalán, metotrexato, mitomicina C o etopósido. Además, los agentes potentes tales como análogos de CC-1065, caliqueamicina, maitansina, análogos de dolastatina 10, rizoxina y palitoxina pueden unirse a los anticuerpos anti-CD40 o sus agentes.

30 En algunas realizaciones específicas, el agente citotóxico o citostático es auristatina E (también conocida en la técnica como dolastatina-10) o su derivado. Típicamente, el derivado de auristatina E es, p. ej., un éster formado entre aurastatina E y un ácido ceto. Por ejemplo, una auristatina E puede hacerse reaccionar con ácido paraacetilbenzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otros derivados de auristatina típicos incluyen AFP, MMAF y MMAE. La síntesis y estructura de la auristatina E y sus derivados se describen, por ejemplo, en las publicaciones de solicitudes de patentes estadounidenses No. 2004-0157782 A1 y 2005-0238649; solicitud de patente internacional nº PCT/US03/24209, solicitud de patente internacional nº PCT/US02/13435, y patentes estadounidenses Nos. 6.884.869; 6.323.315; 6.239.104; 6.034.065; 5.780.588; 5.665.860; 5.663.149; 5.635.483; 5.599.902; 5.554.725; 5.530.097; 5.521.284; 5.504.191; 5.410.024; 5.138.036; 5.076.973; 4.986.988; 4.978.744; 4.879.278; 4.816.444; y 4.486.414.

35 En realizaciones específicas, el agente citotóxico es un ligando de unión al surco menor de DNA. (Véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 6.130.237). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ligando de unión al surco menor es un compuesto CBI. En otras realizaciones, el ligando de unión al surco menor es una enediina (p. ej., caliqueamicina).

40 Los ejemplos de agentes antitubulina incluyen, aunque sin limitarse a ello, taxanos (p. ej., Taxol® (paclitaxel), Taxotere® (docetaxel)), T67 (Tularik), vinca-alcaloides (p. ej., vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina), y dolastatinas (p. ej., auristatina E, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB). Otros agentes antitubulina incluyen, por ejemplo, derivados de bacatina, análogos de taxano (p. ej., epotilona A y B), nocodazol, colquicina y colcimid, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, combretastatinas, discodermólido y eleuterobina.

45 En algunas realizaciones, el agente citotóxico es un maitansinoide, otro grupo de agentes anti-tubulina. Por ejemplo, en realizaciones específicas, el maitansinoide es maitansina o DM-1 (ImmunoGen, Inc.; véase también Chari et al., 1992, Cancer Res. 52:127-131).

En algunas realizaciones, el agente terapéutico no es un radioisótopo.

En algunas realizaciones, el agente citotóxico o inmunosupresor es un antimetabolito. El antimetabolito puede ser, por ejemplo, un antagonista de purina (p. ej., aziotiprina o micofenolato mofetil), un inhibidor de dihidrofolato reductasa (p. ej., metotrexato), aciclovir, gangciclovir, zidovudina, vidarabina, ribavarina, azidotimidina, citidina arabinósido, amantadina, didesoxiuridina, yododesoxiuridina, poscamet o trifluridina.

- 5 En otras realizaciones, el agente citotóxico o inmunosupresor es tacrolimus, ciclosporina o rapamicina. En otras realizaciones, el agente citotóxico es aldesleucina, alemtuzumab, alitretinoína, alopurinol, altretamina, amifostina, anastrozol, trióxido de arsénico, bexaroteno, bexaroteno, calusterona, capecitabina, celecoxib, cladribina, Darbepoetin alfa, Denileukin difitox, dexrazoxana, dromostanolona propionato, epirubicina, Epoetin alfa, estramustina, exemestano, Filgrastim, floxuridina, fludarabina, fulvestrant, gemcitabina, gemtuzumab ozogamician, goserelina, idarrubicina, ifosfamida, imatinib mesilato, Interferón alfa-2a, irinotecán, letrozol, leucovorina, levamisol, mecloretamina o mostaza de nitrógeno, megestrol, mesna, metotrexato, metoxsalen, mitomicina C, mitotano, nandrolona fenpropionato, oprelvekin, oxaliplatin, pamidronato, pegademasa, pegaspargasa, pegfilgrastim, pentostatina, pipobroman, plicamicina, porfímero sódico, procarbazona, quinacrina, rasburicasa, revlimid, Sargramostim, estreptozocina, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, testolactona, tioguanina, toremifeno, Tositumomab, Trastuzumab, tretinoína, mostaza de uracilo, valrubicina, vinblastina, vincristina, vinorelbina y zoledronato.

- En realizaciones adicionales, el fármaco es un anticuerpo monoclonal anti-HER2 humanizado. RITUXAN (rituximab; Genentech, Inc., South San Francisco, Calif.); un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico); OVAREX (AltaRex Corporation, MA); PANOREX (Glaxo Wellcome, NC; un anticuerpo IgG2a murino); Cetuximab Erbitux (Imclone Systems Inc., NY; un anticuerpo quimérico anti-EGFR IgG); Vitaxin (MedImmune, Inc., MD); Campath I/H (Leukosite, MA; un anticuerpo IgG1 humanizado); Smart MI95 (Protein Design Labs, Inc., CA; un anticuerpo anti-CD33 IgG humanizado); LymphoCide (Immunomedics, Inc., NJ; un anticuerpo anti-CD22 IgG humanizado); Smart ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA; un anticuerpo anti-HLA-DR humanizado); Oncolym (Techniclone, Inc., CA; un anticuerpo anti-HLA-Dr10 murino radiomarcado); Allomune (BioTransplant, CA; un anti-CD2 mAb humanizado); Avastin (Genentech, Inc., CA; un anticuerpo anti-VEGF humanizado); Epratuzamab (Immunomedics, Inc., NJ and Amgen, CA; un anticuerpo anti-CD22); y CEAcide (Immunomedics, NJ; un anticuerpo anti-CEA humanizado).

- Otros anticuerpos adecuados incluyen, aunque sin limitarse a ello, anticuerpos contra los siguientes antígenos: CA125, CA15-3, CA19-9, L6, Lewis Y, Lewis X, alfafetoproteína, CA 242, fosfatasa alcalina placentaria, antígeno específico de próstata, fosfatasa de ácido prostático, factor de crecimiento epidérmico, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, receptor antitransferrina, p97, MUC1-KLH, CEA, gp100, MART1, antígeno específico de próstata, receptor de IL-2, CD20, CD52, CD33, CD22, gonadotropina coriónica humana, CD38, mucina, P21, MPG y producto oncogénico Neu.

- En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un agente inmunosupresor. El agente inmunosupresor puede ser, por ejemplo, ganciclovir, etanercept, tacrolimus, ciclosporina, rapamicina, ciclofosfamida, aziotiprina, micofenolato mofetil o metotrexato. Alternativamente, el agente inmunosupresor puede ser, por ejemplo, un glucocorticoide (p. ej., cortisol o aldosterona) o un análogo de glucocorticoides (p. ej., prednisona o dexametasona).

Los inhibidores de ciclooxigenasa adecuados incluyen ácido meclofenámico, ácido mefenámico, carprofeno, diclofenac, diflunisal, fenbufeno, fenoprofeno, ibuprofeno, indometacina, cetoprofeno, nabumetona, naproxeno, sulindac, tenoxicam, tolmetin y ácido acetilsalicílico.

- 40 Los inhibidores de lipoxigenasa adecuados incluyen inhibidores redox (por ejemplo, derivados de catecol-butano, ácido nordihidroguayarático (NDGA), masoprocol, fenidona, lanopaleno, indazolinonas, nafazatrón, benzofuranol, alquilhidroxilamina), e inhibidores no redox (por ejemplo, hidroxitiazoles, metoxialquiltiazoles, benzopiranos y sus derivados, metoxitetrahidropirano, ácidos boswélicos y derivados acetilados de ácidos boswélicos, y ácidos quinolinmetoxifenilacéticos sustituidos con radicales cicloalquilo) y precursores de inhibidores redox.

- 45 Otros inhibidores de lipoxigenasa adecuados incluyen antioxidantes (p. ej., fenoles, propilgalato, flavonoides y/o sustratos naturales que contienen flavonoides, derivados hidroxilados de las flavonas, flavonol, dihidroquercetina, luteolina, galangina, orobol, derivados de calcona, 4,2',4'-trihidroxicalcona, orto-aminofenoles, N-hidroxiureas, benzofuranoles, ebselen y especies que aumentan la actividad de las selenoenzimas reductoras), agentes quelantes de hierro (p. ej., ácidos hidroxámicos y sus derivados, N-hidroxiureas, 2-bencil-1-naftol, catecoles, hidroxilaminas, carnosol trolox C, catecol, naftol, sulfasalazina, zyleuton, ácido 5-hidroxi-antranílico y 4-(ácidos omega-arialquil)fenilalcanoicos), compuestos que contienen imidazol (p. ej., cetoconazol e itraconazol), fenotiazinas y derivados de benzopirano.

- 55 Otros inhibidores de la lipoxigenasa adecuados incluyen inhibidores de eicosanoides (por ejemplo, ácidos octadecatetraenoico, eicosatetraenoico, docosapentaenoico, eicosahexaenoico y docosahexaenoico y sus ésteres, PGE1 (prostaglandina E1), PGA2 (prostaglandina A2), viprostol, ácidos 15-monohidroxi-eicosatetraenoico, 15-monohidroxi-eicosatrienoico y 15-monohidroxi-eicosapentaenoico, y leucotrienos B5, C5 y D5), compuestos que interfieren con los flujos de calcio, fenotiazinas, difenilbutilaminas, verapamilo, fusósido, curcumina, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido 5,8,11,14-eicosatetrayenoico (ETYA), hidroxifenilretinamida, lonapaleno, esculina, dietilcarbamazina, fenantrolina, baicaleína, proxicromil, tioéteres, sulfuro de dialilo y sulfuro de di-(1-propenilo).

Los antagonistas de los receptores de leucotrieno incluyen calcitriol, ontazolast, Bayer Bay-x-1005, Ciba-Geigy CGS-25019C, ebselen, Leo Denmark ETH-615, Lilly LY-293111, Ono ONO-4057, Terumo TMK-688, Boehringer Ingelheim BI-RM-270, Lilly LY 213024, Lilly LY 264086, Lilly LY 292728, Ono ONO LB457, Pfizer 105696, Perdue Frederick PF 10042, Rhone-Poulenc Rorer RP 66153, SmithKline Beecham SB-201146, SmithKline Beecham SB-201993, 5 SmithKline Beecham SB-209247, Searle SC-53228, Sumitamo SM 15178, American Home Products WAY 121006, Bayer Bay-o-8276, Warner-Lambert CI-987, Warner-Lambert CI-987BPC-15LY 223982, Lilly LY 233569, Lilly LY-255283, MacroNex MNX-160, Merck and Co. MK-591, Merck and Co. MK-886, Ono ONO-LB-448, Purdue Frederick PF-5901, Rhone-Poulenc Rorer RG 14893, Rhone-Poulenc Rorer RP 66364, Rhone-Poulenc Rorer RP 69698, Shionogi S-2474, Searle SC-41930, Searle SC-50505, Searle SC-51146, Searle SC-52798, SmithKline Beecham 10 SK y F-104493, Leo Denmark SR-2566, Tanabe T-757 y Teijin TEI-1338.

Artículos de elaboración

En otro aspecto, se incluye un artículo de elaboración que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de elaboración comprende un envase y una etiqueta. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los envases pueden estar formados 15 de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril. Por ejemplo, el envase puede tener una bolsa con solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica. El agente activo en la composición es el anticuerpo anti-CD40 humanizado. La etiqueta en el envase o asociada al envase indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. El artículo de elaboración puede además 20 comprender un segundo envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede además incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

La invención se describe además en los siguientes ejemplos, que no tienen como fin limitar el alcance de la 25 invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Producción de anticuerpo anti-CD40 humanizado

Los anticuerpos murinos 20E2 y 2H11 se muestran en las Tablas 1 y 2 anteriormente expuestas. Se ha completado la humanización de 20E2 y 2H11. Se creó una genoteca donde los residuos humanos y murinos variaron en modo 30 tal que en cualquier posición determinada podía haber o bien un residuo humano o uno murino. Dicha genoteca se creó para aminoácidos que eran diferentes entre la línea germinal humana y el anticuerpo murino. Se seleccionaron solamente los clones que retenían la función del anticuerpo murino parental.

De este modo, se humanizaron el Anticuerpo a, el Anticuerpo B y el Anticuerpo C derivados de anticuerpo 20E2 de 35 ratón (Anticuerpo A y Anticuerpo B) o 2H11 (Anticuerpo C) clonados en la estructura principal IgG1-KO (KO=inactivada-out)/kappa humana. IgG1-KO tiene dos mutaciones en la región Fc, Leu234Ala y Leu235Ala para reducir FcyR y la unión del complemento.

Los resultados de dicha humanización produjeron diversas secuencias variables de cadena pesada y ligera humanizadas que se muestran a continuación:

SEQ ID NO: 41 (secuencia de cadena ligera variable):

40 DIVMTQSPDLSAVSLGERVTMSCKSSQSLLSNGNQKNYLTWHQQKPGQPPELLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDF
TLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGKVEIK

SEQ ID NO: 42 (secuencia de cadena pesada variable):

EVQLVKSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSFDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:43 (secuencia de cadena ligera variable)

DIVMTQSPDLSAVSLGERATMSCKSSQSLLSNGNQKNYLTWHQQKPGQPPELLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDF
TLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGKVEIK

45 SEQ ID NO: 44 (secuencia de cadena pesada variable)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSFDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 45 (secuencia de cadena ligera variable)

DIVMTQSPDSLAVSLGKVTMNCSSQSLNLSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSSTDF
TLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGAGTKVEIK

SEQ ID NO: 46 (secuencia de cadena pesada variable)

EVQLVESGGGLVKPGGSRRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWGQGLTLTVSS.

5 SEQ ID NO: 47 (secuencia de cadena ligera variable)

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCSSQSLNLSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSSTDF
TLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGKTKVEIK

SEQ ID NO: 48 (secuencia de cadena pesada variable)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWGQGLTLTVSS

SEQ ID NO: 49 (secuencia de cadena ligera variable)

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCSSQSLNLSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSSTDF
10 TLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGAGTKVEIK

SEQ ID NO: 50 (secuencia de cadena ligera variable)

EVQLVESGGGLVKPGGSRRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGLTLTVSS

SEQ ID NO: 51 (secuencia de cadena ligera variable)

DIVMTQSPDSLAVSLGKVTMNCSSQSLNLSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSSTDF
15 TLTISSLQAEDLAVYYCQNDYTYPLTFGAGTKVEIK.

15 SEQ ID NO: 52 (secuencia de cadena ligera variable)

DIVMTQSPDSLAVSLGKVTINCKSSQSLNLSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSSTDF
TLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGKTKVEIK

SEQ ID NO: 53 (secuencia de cadena pesada variable)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGLTLTVSS

SEQ ID NO: 54 (secuencia de cadena ligera variable)

QIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCSASSSVSYMLWFQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPARFSGSGSSTDFTLTISSL
20 QPEDFATYYCQQRFTFYPTFGGGKTKVEIK

SEQ ID NO:55 (secuencia de cadena ligera variable)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCSASSSVSYMLWFQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPARFSGSGSSTDFTLTISSL
QPEDFATYYCQQRFTFYPTFGGGKTKVEIK

SEQ ID NO:56 (secuencia de cadena ligera variable)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCSASSSVSYMLWFQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPARFSGSGSSTDFTLTISSL
QPEDFATYYCQQRFTFYPTFGGGKTKVEIK

25 SEQ ID NO:57 (secuencia de cadena pesada variable)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGFNITDYVHWVKQRPGQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFGKATMTADTSTST
TVYMEISSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTGYWGQGLTLTVSS.

SEQ ID NO:58 (secuencia de cadena pesada variable)

ES 2 807 217 T3

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGFNIKDYVHVKQAPGQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFGKATMTADTSTS
TVYMESSLRSED TAVYYCTTSYYVGTGYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:59 (secuencia de cadena pesada variable)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGFNITDYVHVKQRPGQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFGKVTMTADTSTS
TVYMESSLRSED TAVYYCTTSYYVGTGYWGQGLVTVSS .

SEQ ID NO:60 (secuencia encontrada pesada variable)

5 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGFNIKDYVHVKQAPGQGLEWIGRIDPEDGDSKYAPKFGKATMTADTSTS
TVYMESSLRSED TAVYYCTTSYYVGTGYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:61 (secuencia pesada variable)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGFNITDYVHVKQAPGQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFGKATMTADTSTS
TVYMESSLRSED TAVYYCTTSYYVGTGYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:62 (secuencia de cadena pesada variable):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGFNITDYVHVKQRPGQGLEWMGRIDPEDGDTKFAKFGKATMTADTSTS
TVYMESSLRSED TAVYYCTTSYYVGTGYWGQGLVTVSS

10 SEQ ID NO:63 (secuencia pesada variable)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGFNITDYVHVKQRPGQGLEWMGRIDPEDGDTKFAKFGKVTMTADTSTS
TVYMESSLRSED TAVYYCTTSYYVGTGYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:64 (secuencia pesada variable)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGFNIKDYVHVKQAPGQGLEWIGRIDPEDGDTKFAKFGKATMTADTSTS
TVYMESSLRSED TAVYYCTTSYYVGTGYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:65 (secuencia pesada variable)

15 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGFNIKDYVHVKQAPGQGLEWMGRIDPEDGDTKFAKFGKATMTADTSTS
TVYMESSLRSED TAVYYCTTSYYVGTGYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:66 (secuencia pesada variable)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSTASGFNITDYVHVKQAPGQGLEWMGRIDPEDGDTKFAKFGKATMTADTSTS
TVYMESSLRSED TAVYYCTTSYYVGTGYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:67 (secuencia pesada variable)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIDYVHVKQRPGKGLEWMGRIDPEDGDTKYDPKFGQGRVTMTADTSTD
TAYMESSLRSED TAVYYCTTSYYVGTGYWGQGLVTVSS

20 SEQ ID NO:68 (secuencia pesada variable)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIDYVHVKQRPGKGLEWMGRIDPEDGDTKYDPKFGQGRVTMTADTSTD
TAYMESSLRSED TAVYYCTTSYYVGTGYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:69 (secuencia pesada variable)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIDYVHVKQRPGKGLEWMGRIDPEDGDTKYDPKFGKVTMTADTSTD
TAYMESSLRSED TAVYYCTTSYYVGTGYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:70 (secuencia pesada variable)

25 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIDYVHVKQAPGKGLEWMGRIDPEDGDTKYDPKFGKATMTADTSTD
TAYMESSLRSED TAVYYCTTSYYVGTGYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:71 (secuencia pesada variable)

ES 2 807 217 T3

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIDYIHWVKQRPQKGLEWMMGRIDPEDGDTKYDPKFQGGKATMTADTSTD
TAYMELSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTGYGQGGTTVTVSS

SEQ ID NO:72 (secuencia pesada variable)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIDYIHWVKQAPGKGLEWIGRIDPEDGDTKYDPKFQGGKATMTADTSTD
TAYMELSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTGYGQGGTTVTVSS

SEQ ID NO:73 (secuencia pesada variable)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIDYIHWVQAPGKGLEWMMGRIDPEDGDTKYDPKFQGRVTMTADTSTD
TAYMELSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTGYGQGGTTVTVSS

5

SEQ ID NO:74 (secuencia ligera variable) 1 del anticuerpo 10F2Hum:

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCSATSSVSYILWFQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISL
QPEDFATYYCQRTFYPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 75 (secuencia ligera variable) 2 del anticuerpo 10F2Hum:

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCSATSSVSYILWFQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPARFRSGSGSGTDFTLTISL
QPEDFATYYCQRTFYPYTFGGGTKVEIK

10

SEQ ID NO: 76 (secuencia ligera variable)

QIQMTQSPSSLSASVGRVTITCSATSSVSYILWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPARFRSGSGSGTDFTLTISL
QPEDFATYYCQRTFYPYTFGGGTKVEIK

Los anticuerpos humanizados ilustrativos descritos son los que tienen las secuencias de cadena pesada y ligera expuestas en la siguiente tabla. Las secuencias subrayadas y en negrita en la tabla siguiente son los dominios variables, mientras que las secuencias no subrayadas normales son los dominios constantes:

Identidad	Secuencia	SEQ ID NO:
Anticuerpo A (Cadena ligera)	<p><u>DI</u>VMTQSPD<u>SLAVSLGERATM</u>CKSSQ<u>SL</u>LNSGN<u>QKNYL</u>TW</p> <p><u>HQ</u>QKPG<u>QPP</u>KLLI<u>YWT</u>STRESG<u>VPDR</u>FRSGSGSGTD<u>FTLT</u>IS</p> <p><u>SLQ</u>AED<u>VAVYYCQ</u>NDY<u>TYPL</u>TFGGGTK<u>VEIKR</u>TVAAPSVFI</p> <p>FPSPDEQLKSGTASVVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGN</p> <p>SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ</p> <p>GLSSPVTKSFNRGEC</p>	26
Anticuerpo A (Cadena pesada, IgG1KO)	<p><u>EVQ</u>L<u>VES</u>GGGL<u>VK</u>PG<u>SLRL</u>SCAAS<u>GFT</u>FS<u>DYGM</u>HW<u>VRQ</u>AP</p> <p><u>GK</u>GLEW<u>VAYI</u>SSGN<u>RII</u>Y<u>AD</u>TV<u>KGR</u>FTISR<u>DN</u>AK<u>NSLY</u>LQ</p> <p><u>MNS</u>LRAED<u>TALY</u>CAR<u>QD</u>GY<u>RYAM</u>DY<u>WAQ</u>GL<u>LV</u>TVSSASTK</p> <p>GPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA</p> <p>LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN</p> <p>HKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTCTPPCPAPEAAGGPSVFLFP</p> <p>PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH</p> <p>NAKTRPREEQYNSYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK</p> <p>ALPAPIEKTI<u>SKAK</u>GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT<u>C</u></p> <p>L<u>VK</u>GFYPSDI<u>AVE</u>WESNGQPENNYK<u>TP</u>PVLDSDGSFFLY<u>S</u></p> <p>KLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	27

<p>Anticuerpo A (Cadena Pesada, IgG1)</p>	<p><u>EVQLVESGGGLV^KPGGSLRLS^{CAASGFTTFSDYGMHWRQAP}</u> <u>GKGLEWVAY^ISSGNRI^{IYYADTVKGRFTISRDN}AKNSLY^{LQ}</u> <u>MNSLRAEDTALY^{CARQDGYRYAMDYWAQ}GLTV^{VSS}ASTK</u> GPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRV^EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF^P PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAP^{IEKTI}SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT^C LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK^{TP}PVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNV^FSCSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>28</p>
<p>Anticuerpo A (Cadena pesada, IgG4DM)</p>	<p><u>EVQLVESGGGLV^KPGGSLRLS^{CAASGFTTFSDYGMHWRQAP}</u> <u>GKGLEWVAY^ISSGNRI^{IYYADTVKGRFTISRDN}AKNSLY^{LQ}</u> <u>MNSLRAEDTALY^{CARQDGYRYAMDYWAQ}GLTV^{VSS}ASTK</u> GPSVFFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFEFGGSPVFLFPPK^P KDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL^P SSI^{EKTI}SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK^{TP}PVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNV^FSCSMHEALHNHYTQKSLSLSLGK</p>	<p>29</p>
<p>Anticuerpo A (Pesada, IgG1KOb)</p>	<p><u>EVQLVESGGGLV^KPGGSLRLS^{CAASGFTTFSDYGMHWRQAP}</u> <u>GKGLEWVAY^ISSGNRI^{IYYADTVKGRFTISRDN}AKNSLY^{LQ}</u> <u>MNSLRAEDTALY^{CARQDGYRYAMDYWAQ}GLTV^{VSS}ASTK</u> GPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRV^EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF^P PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAP^{IEKTI}SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT^C LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK^{TP}PVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNV^FSCSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>30</p>
<p>Anticuerpo B (Cadena ligera)</p>	<p><u>DIVMTQSPD^{SLAVSLG}EKVTINCKSSQ^{LLNSGNQ}KNYL</u> <u>TWHQ^{QKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSDT}DFT</u> <u>LTIS^{SLQAEDVAVYQCNDYTYPLTFGGG}TKVEIK^{RTVA}</u> APSVFI^{FPPSDEQLKSGTASVVCLLN}NFYPREAKVQW^{KV} DNALQSGNSQESVTEQDSK^{STYLSSTLTLSKADY}EKH K^{VYACEVTHQGLSPVTKSFNR}GEC</p>	<p>31</p>
<p>Anticuerpo B (Cadena pesada, IgG1KO)</p>	<p><u>EVQLVESGGGLV^KPGGSLRLS^{CAASGFTTFSDYGMHWRQAP}</u> <u>GKGLEWVAY^ISSGNRI^{IYYADTVKGRFTISRDN}AKNSLY^{LQ}</u> <u>MNSLRAEDTAVY^{CARQDGYRYAMDYWGQ}GLTV^{VSS}ASTK</u> GPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRV^EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF^P PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAP^{IEKTI}SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT^C LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK^{TP}PVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNV^FSCSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>32</p>

ES 2 807 217 T3

<p>Anticuerpo B (Cadena Pesada, IgG1)</p>	<p><u>EVQLVESGGGLV^QPGGSLRLS^{CAASGFTFS}DYGMHWRQAP</u> <u>GKGLEWVAYI^{SSGNRIIYYADTVKGRFTISR}DNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGLTVTVSS</u>ASTK GPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTI^{SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT}C LVKGFYP^{SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDS}DGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNV^{FSCSVMHEALHNHYTQKSLS}SLSPGK</p>	<p>33</p>
<p>Anticuerpo B (Cadena pesada, IgG4 DM)</p>	<p><u>EVQLVESGGGLV^QPGGSLRLS^{CAASGFTFS}DYGMHWRQAP</u> <u>GKGLEWVAYI^{SSGNRIIYYADTVKGRFTISR}DNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGLTVTVSS</u>ASTK GPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGGPSVFLFPKPK KDTLMTSRTPEVTCVVVDV^{SOEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK} TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTI^{SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK} GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDS^{DGSFFLYSRLT} VDKSRWQEGNV^{FSCSVMHEALHNHYTQKSLS}SLSLGK</p>	<p>34</p>
<p>Anticuerpo B (Cadena pesada, IgG1KOb)</p>	<p><u>EVQLVESGGGLV^QPGGSLRLS^{CAASGFTFS}DYGMHWRQAP</u> <u>GKGLEWVAYI^{SSGNRIIYYADTVKGRFTISR}DNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGLTVTVSS</u>ASTK GPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCKDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTI^{SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT}C LVKGFYP^{SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDS}DGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNV^{FSCSVMHEALHNHYTQKSLS}SLSPGK</p>	<p>35</p>
<p>Anticuerpo C (Cadena ligera)</p>	<p><u>DIQMTQSPSSLSASV^{DRVTITCSASSSVSYMLWFQ}</u> <u>QKPKGKAPKLLI^{YSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTL}</u> <u>TIS^{SLQPEDFATYYCQRTFYPYTFGGGTKVEIKRT}</u> VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV^{VCLLNNFYPREAK} VQW^{KVDNALQSGNSQESVTEQDSK}DSTYSLSTLTL SKADY^{EKKHVVYACEVTHQGLSSPVT}KSENRGEC</p>	<p>36</p>
<p>Anticuerpo C (Cadena pesada, IgG1KO)</p>	<p><u>QVQLVQSGAEV^{KGASVKV}SCTASGFNIKDYV^{HVKQAP}</u> <u>QGLEWMGRID^{PDGDSKYAPKFOGKATMTADTSTSTVYME}</u> <u>LSSLRSED^{TAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGLTVTVSS}</u>ASTKG PSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN KPSNTKVDKRVKPKSCKDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTI^{SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL} VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDS^{DGSFFLYSK} LTVDKSRWQQGNV^{FSCSVMHEALHNHYTQKSLS}SLSPGK</p>	<p>37</p>

Anticuerpo C (Cadena Pesada, IgG1)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>QGQLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFOGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTGYGWCQGLTLVTVSS</u> ASTKG PSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPEVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	38
Anticuerpo C (Cadena pesada, IgG4 DM)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>QGQLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFOGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTGYGWCQGLTLVTVSS</u> ASTKG PSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKHTCPPCPAPEFEGGPPSVFLFPPKPK DTLMIISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPEVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	39
Anticuerpo C (Cadena pesada, IgG1KOb)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>QGQLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFOGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTGYGWCQGLTLVTVSS</u> ASTKG PSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPEVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	40

Las diversas regiones se subclonaron en uno o dos vectores de expresión de IgG adecuados:

A) un formato IgG1-KO humano (knock-out)/kappa con una mutación doble Leu234Ala, Leu235Ala en la región Fc para reducir la función efectora tal como FcγR y la unión del complemento

- 5 B) un formato IgG4-DM humano (doble mutante)/kappa con una mutación Ser228Pro en la región bisagra para reducir la ocurrencia de medias moléculas de IgG4 y una mutación Leu235Glu para reducir aún más la unión de FcγR

Los dos candidatos de Anticuerpo A y Anticuerpo B se purificaron y evaluaron mediante los siguientes criterios:

Aspecto de CCF (turbidez)

- 10 Propiedades de filtración de CCF

Rendimiento en rProteinA

Turbiedad tras elución y neutralización

Agregados solubles (SEC)

Patrón de pureza/contaminación (SDS)

- 15 Patrón de carga (IEF)

Ejemplo 2: Datos *in vitro*

El Anticuerpo A, Anticuerpo B y Anticuerpo C se caracterizaron junto con los anticuerpos 4D11 (Kirin/ Astellas) y PG-102 (PanGenetics) que se produjeron en base a secuencias publicadas. Los datos para el Anticuerpo, Anticuerpo B, Anticuerpo C y 4D11 se muestran a continuación. PG-102 exhibió actividad agonista y solamente inhibición

incompleta de proliferación de células B (no se muestra). La Tabla 2.2. resume los datos obtenidos. A continuación de la Tabla 2.2 se expone una descripción más detallada de los datos.

Tabla 2.2. Resumen de los datos *in vitro* del Anticuerpo A, Anticuerpo B y Anticuerpo C y anticuerpo 4D11 anti-CD40 de Kirin.

Parámetro/Ensayo	Anticuerpo A	Anticuerpo B	Anticuerpo C	4D11
Kd +/- suero hu.	<100 pM	<100 pM	<100 pM	<100 pM
Unión celular (EC50/nM ± SD)	1,2 (±0,28)	1,5 (±0,68)	1,7 (±0,28)	0,9 (±0,3)
Proliferación de células B:Antagonismo (IC50/nM±SD)	0,3 (±0,13)	0,2 (±0,10)	0,1 (±0,004)	0,03 (±0,02)
Proliferación de células B:Agonismo (SI*) (IC50/nM±SD)	Sin agonismo (SI <2)			
Células dendríticas/IL-12/23p40 Antagonismo (IC50/nM ± SD)	< 1nM	< 1nM	< 1nM	< 1nM
Células dendríticas/IL-12/23p40 Agonismo	Sin agonismo	Sin agonismo	Sin agonismo	Sin agonismo
Reacción cruzada de especies.: Unión Hu/Cyno (relaciones EC50**)	3	2	1	No ensayado

* SI, índice de estimulación; ** Relación > 1 significa mayor unión a Cyno en comparación con humanos

5

A. Unión de anticuerpos humanizados a la proteína CD40 celular y CD40 recombinante

La unión específica de anticuerpos humanizados a CD40 celular se analizó por citometría de flujo usando células HEK293 transfectadas con CD40 humana. Se observó la unión dependiente de la concentración de Anticuerpo A, Anticuerpo B y Anticuerpo C. Los anticuerpos exhibieron un perfil de unión similar en la Figura 1B. Los valores de EC50 de los anticuerpos de la presente invención y del anticuerpo 4D11 de Kirin están todos en el mismo rango de ~1 nM que es muy probable que esté en el límite de sensibilidad del ensayo debido a los altos niveles de CD40 en las células transfectadas. La unión específica de anticuerpos humanizados a CD40 celular en células Ramos humanas también demostró unión dependiente de la concentración. Los anticuerpos exhibieron perfiles de unión levemente diferentes (se muestran en la Figura 2) y valores CE50 entre 0,21-1,22 nM. No se detectó unión en células CD40 negativas tales como las células HEK293 no transfectadas o la línea de células T HSB-2, confirmando así la unión selectiva a CD40 (no se muestran los datos).

La afinidad de unión del Anticuerpo A, Anticuerpo B y Anticuerpo C a la proteína CD40-Fc humana se midió mediante el octeto ForteBio y reveló constantes de disociación (K_D) de <100 pM. Debido a la aivez de bivalencia del anticuerpo y CD40-Fc los efectos evitan que se determinen precisamente K_D s debajo de 100 pM. Además, la unión a CD40-Fc se analizó en ausencia y presencia de 50% de suero humano y no se observó ningún efecto significativo del suero en la unión (no se muestran datos)

B. Actividad de anticuerpos humanizados en ensayos de activación/proliferación de células B

La actividad de los anticuerpos humanizados se ensayó en un ensayo de proliferación de células B en el que las células B humanas derivadas de sangre periférica se estimulan con CD40L recombinante en presencia de IL-2 e IL-4. El Anticuerpo A, Anticuerpo B y Anticuerpo C demostraron una inhibición potente de la proliferación de células B (se muestra en las Figuras 3A y 3B). La comparación con las curvas de inhibición y los valores de IC50 de los anticuerpos de BI y el anticuerpo de Kirin 4D11, indica que el anticuerpo 4D11 tiene una potencia más alta (Figura 3B y 4) cuando se analiza a través de múltiples donantes. Cuando se probaron para actividad agonística en ausencia de CD40L, anticuerpos, Anticuerpo B, Anticuerpo A y Anticuerpo C no indujeron ninguna proliferación de células B por encima de los niveles de fondo en concentraciones de hasta 10 µg/ml (67 nM) (mostrado en la Figura 4) similar al anticuerpo 4D11.

El anticuerpo competidor 4D11 pareció ser ligeramente más potente con una IC50 media de ~0,02 nM y ausencia de efectos agonísticos. Los datos para los tres anticuerpos BI y 4D11 se resumen en la Figura 4 y en la Tabla 2.2 anterior. Otro anticuerpo competidor, PG-102 (derivado del clon 5D12), también estudiado en este ensayo, exhibió

efectos agonistas significativos estimulando la proliferación de células B en ausencia de CD40L (Figura 4). En consecuencia, la falta de actividad agonista de cuatro candidatos iniciales los diferencia claramente de PG-102.

En un segundo ensayo, los anticuerpos se evaluaron para inhibición de aumento de CD86 en células B humanas. En este caso, el ensayo se llevó a cabo con sangre completa humana o células B purificadas, ambas en presencia de CD40L exógeno. De acuerdo con los datos de proliferación de células B, el Anticuerpo B, el Anticuerpo A y el Anticuerpo C ensayados en sangre completa humana demostraron inhibición potente de aumento de CD86 mediado por CD40 según lo medido por citometría de flujo (se muestra en la Figura 5). El Anticuerpo C exhibió potencia similar a 4D11 en este ensayo, mientras que la potencia del Anticuerpo B y el Anticuerpo A fue algo más débil. La comparación del Anticuerpo B y 4D11 en células B purificadas o en sangre completa muestra que la potencia del Anticuerpo B (valores CI50 y CI90) permanece relativamente inalterada para células B purificadas en comparación con células B en presencia de otras células o suero que portan CD40, mientras que 4D11 sufre un drástico cambio en potencia en las condiciones de sangre completa (se muestra en la Figura 6).

Se han creado datos similares cuando el Anticuerpo B, el Anticuerpo A y el Anticuerpo C se evaluaron para inhibición de aumento de CD86 en células B de mono cynomolgus cuando se realizó con muestras de sangre completa (se muestra en la Figura 7). El Anticuerpo B, Anticuerpo A y Anticuerpo C ensayados en sangre completa de mono cynomolgus demostraron inhibición potente de aumento de CD86 mediado por CD40, según lo medido por citometría de flujo. Estos anticuerpos demuestran, por lo tanto, la reactividad cruzada funcional a CD40 de mono cynomolgus con potencia similar a la CD40 humana.

La actividad de IgG1KOb del Anticuerpo B e IgG1WT del Anticuerpo B se evaluó para capacidad de mediar en la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (Figura 13). En este ensayo, se incubaron células RAMOS con PBMC humanos en una relación efector a célula diana de 50:1. IgG1KOb del Anticuerpo B y IgG1WT del Anticuerpo B se titularon a partir de 20 ug/ml, y el grado de muerte celular se monitoreó por liberación de LDH. Los datos exhibidos pertenecen a un experimento respectivo. Los datos muestran que IgG1Wt 20E2-12-RlgG1WT del Anticuerpo A es un mediador eficaz de ADCC y que IgG1KOb del Anticuerpo B, que contiene las mutaciones que eliminan la función efectora, no tiene actividad ADCC.

Ejemplo 3: Estudios de farmacocinética/farmacodinámica

A. Administración iv única de Anticuerpo A y Anticuerpo B a 1 o 10 mg/kg en monos cynomolgus

El Anticuerpo A y el Anticuerpo B se dosificaron cada uno a 1 y 10 mg/kg a monos cynomolgus macho (N=3)/dosis. Se extrajeron muestras de sangre de 0-504 h (3 semanas), se recuperó el suero y las muestras se conservaron a -20°C hasta el análisis. Las muestras se analizaron por sándwich ELISA como se describió anteriormente. Los perfiles de concentración-tiempo en suero de ambos anticuerpos en monos después de las dosis iv y los parámetros de farmacocinética se resumen en la Figura 8 y en las Tablas 2.7.1 (Anticuerpo A) y 2.7.2 (Anticuerpo B) que se exponen a continuación. Ambos anticuerpos demostraron farmacocinéticas dependientes de la dosis que indican que se atribuye una depuración con una dosis baja predominantemente a una disposición mediada por la diana consistente, mientras que con la dosis más alta el anticuerpo se depura principalmente por catabolismo. Se observaron perfiles similares de farmacocinética dependiente de la dosis para otros MAbs que se dirigen a dianas asociadas con membranas (p. ej., CD19, CD20, EGFR, CD146 y HER2). La depuración del Anticuerpo A fue de 0,8 y 0,1 mL/h/kg para las dosis de 1 y 10 mg/kg, respectivamente. La depuración del Anticuerpo B fue de 0,7 y 0,1 mL/h/kg para las dosis de 1 y 10 mg/kg, respectivamente. De manera similar, la semivida del Anticuerpo A fue de 1 y 13 días para las dosis de 1 y 10 mg/kg, respectivamente y la semivida del Anticuerpo B fue de 2 y 13 días para las mismas dosis respectivas. Si bien el Anticuerpo B tuvo una semivida marginalmente más prolongada en la dosis más baja en relación con la misma dosis para el Anticuerpo A, no se esperaría que esta diferencia se tradujera en exposición más sostenida tras la administración crónica. El AUC para ambos compuestos fue supraproporcional y el volumen de distribución (Vss) para ambos compuestos se aproximó al volumen del plasma (~40 mL/kg) que exhibe la distribución tisular limitada que se observa típicamente para terapias proteicas polares grandes. En términos generales, no hubo diferencias apreciables en cuanto a los parámetros de farmacocinética entre los dos anticuerpos.

Tabla 2.7.1: Parámetros de farmacocinética del Anticuerpo A en monos cynomolgus macho (N=3)/dosis después de una sola dosis iv de 1 y 10 mg/kg

Dosis (mg/kg)	CLp (mL/h/kg)	Vss (mL/kg)	AUC (μM.h)	T1/2 (días)	MRT (días)
1	0,8 ± 0,03	41 ± 6	8,0 ± 0,3	0,9 ± 0,2	2,1 ± 0,2
10	0,10 ± 0,02	42 ± 6	660 ± 92	12,6 ± 0,5	17,5 ± 0,3

Tabla 2.7.2: Parámetros de farmacocinética del Anticuerpo B en monos cynomolgus macho (N=3)/dosis después de una sola dosis iv de 1 y 10 mg/kg

Dosis (mg/kg)	CLp (mL/h/kg)	Vss (mL/kg)	AUC ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$)	T1/2 (días)	MRT (días)
1	0,7 \pm 0,16	40 \pm 2	10,1 \pm 2,7	1,5 \pm 0,2	2,6 \pm 0,8
10	0,09 \pm 0,01	41 \pm 6	744 \pm 55	13,3 \pm 3,0	19,3 \pm 4,2

B. Estudio de farmacodinámica ex vivo

Como parte del estudio de PK anteriormente descrito, se analizaron los efectos de farmacodinámica de los anticuerpos anti-CD40. Con este fin, se incubaron muestras de sangre completa con CD40L recombinante durante una noche y se determinó el aumento de expresión de CD86 en células B por citometría de flujo. Las muestras se analizaron en el día 0 (pre-tratamiento), día 2, 7 y 14 después de la administración de la dosis. Aunque el aumento en la expresión de CD86 es relativamente pequeño (~5-20%) se observó un efecto dependiente de la dosis (mostrado en la Figura 9). En el grupo de animales a los que se les administraron 10 mg/kg del Anticuerpo A y el Anticuerpo B, la inducción de CD86 se inhibió completamente en los días 2, 7 y 14 consistentemente con la exposición sostenida en esta dosis. Los animales que recibieron la dosis de 1 mg/kg demostraron inhibición completa en el día 2, inhibición parcial en el día 7 y ninguna inhibición en el día 14. La pérdida del efecto de farmacodinámica con el transcurso del tiempo se correlaciona con una depuración más rápida del anticuerpo en el grupo de la dosis baja.

Ejemplo 4: Estudios relacionados con toxicología: CD40 en plaquetas

CD40 se expresa constitutivamente en plaquetas humanas (Henn, et al., 2001) y (Inwald, et al., 2003), mientras que CD40L se expresa rápida y transitoriamente en la superficie de la célula de las plaquetas activadas (Henn, et al., 2001). Mientras que los anticuerpos anti-CD40 sin la unión de Fc γ R no se esperaría que tuvieran efectos sobre las plaquetas, es importante demostrar directamente que este es el caso. Se realizaron estudios de citometría de flujo para demostrar la unión de los anticuerpos iniciales anti-CD40 a plaquetas de seres humanos y cynomolgus.

Anteriormente se ha demostrado mediante citometría de flujo que el mAb anti-CD40 G28.5 y mAb 89 se unen a las plaquetas humanas en reposo (Henn, et al., 2001). Esto se confirmó usando el anticuerpo G28.5 marcado con FITC. Se realizaron diluciones en serie de 5 veces de G28.5 y se incubó un intervalo de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 0,32ng/ml en 100 μl de plaquetas obtenidas de seres humanos (2 donantes) o monos cynomolgus (3 donantes) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Además, se usó mAb anti-CD45 marcado con APC para identificar plaquetas unidas a otros tipos de células CD40+ a fin de excluir estas células del análisis. Después de la tinción con anticuerpos, las plaquetas se lavaron y se fijaron con Optilyse C y se realizó una citometría de flujo. La intensidad de fluorescencia media (MFI) se determinó como una medida de la unión del anticuerpo a las plaquetas CD45-.

Los anticuerpos comercialmente disponibles 5c3 y los anticuerpos de la invención mAb de ratón anti-CD40 se marcaron con FITC. Se confirmó la unión a células Ramos. La cantidad de moléculas FITC por molécula de anticuerpo osciló entre 2 y 4 FITC por molécula de anticuerpo. Se realizaron cinco diluciones en serie del candidato mAb anti-CD40 mAb comercial, oscilando entre 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 0,32 ng/ml, y se incubaron con plaquetas humanas (3 donantes) y de cynomolgus (2 donantes) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

En la Figura 11 se muestra un gráfico representativo que demuestra la unión del mAb anti-CD40 de ratón candidato a las plaquetas humanas. Los cuatro anticuerpos monoclonales candidatos exhibieron unión específica a las plaquetas, en comparación con el anticuerpo de control isotipo marcado con FITC. 10F2, 2H11, 19B10 y 20E2 demostraron unión comparable a las plaquetas. Se observó una tendencia similar en las plaquetas de cynomolgus (no se muestran los datos).

Además de estos estudios, se comparó la capacidad del Anticuerpo B directamente marcado y 4D11 de unir plaquetas y células B en muestras de sangre completa humanas y de monos cynomolgus (se muestra en la Figura 12). 4D11 exhibió unión similar (según lo ejemplificado por CE50) tanto a células B como a plaquetas en las muestras de sangre humanas y de monos cynomolgus. El Anticuerpo B demostró un patrón similar pero una potencia de unión mucho más débil.

Ejemplo 5: Estudios de farmacología in vivo en el modelo de ratón NSG

La eficacia de los anticuerpos humanizados, Anticuerpo A, se evaluó en un modelo de producción de anticuerpos en el que se inyectaron PBMC humanas en ratones NSG inmunodeficientes con el fin de generar una respuesta de injerto frente a huésped. Se puede detectar una producción significativa de IgM humana (hIgM) e IgG (hIgG) comenzando 2 semanas después del injerto. El tratamiento con el Anticuerpo A a en dosis de 5 y 1 mg/kg inhibió significativamente la respuesta de hIgG y hIgM en las semanas 2 y 3 después del injerto. Se evaluó un anticuerpo comparativo (4D11) con una única dosis de 5 mg/kg y también demostró abolición de la respuesta. En un segundo estudio, todos los anticuerpos, el Anticuerpo A, Anticuerpo B y Anticuerpo C, se ensayaron con una única dosis de 1 mg/kg y demostraron la inhibición total de la respuesta de IgM e IgG en la semana 2 (Figura 10).

Ejemplo 6: Análisis de biomarcadores

Regulación por incremento del receptor: la regulación por incremento de los receptores inducida por CD40L se puede medir mediante citometría de flujo. Se puede estimular sangre completa humana con una concentración optimizada de CD40L soluble y el porcentaje total de CD20+Receptor+ células se puede medir por citometría de flujo. El cambio en porcentaje de expresión de CD86 en células CD20 positivas se midió en paralelo al estudio pk de cyanomologous que evalúa los Anticuerpos A y B (Figura 9). Los datos muestran la inhibición del aumento de CD86 en puntos de tiempo consistentes con la exposición de los anticuerpos.

Proteómica dirigida: La mayor secreción de proteínas tras la estimulación de CD40 en sangre completa se puede usar como biomarcador(es) potencial(es). Se establecieron una concentración optimizada de CD40L soluble y tiempo de estimulación usando la plataforma de perlas multiplex Luminex que detecta MDC/CCL22 y varias otras proteínas segregadas. Las muestras clínicas se evaluarán a partir de sangre completa en una gama de dosis total de anti-CD40 mAb.

Ocupación del receptor: la ocupación del receptor CD40 puede determinarse en un ensayo *in vitro* o *ex vivo* basado en el análisis de citometría de flujo de células B en sangre humana completa. Candidatos actuales El anticuerpo de la presente invención y el anticuerpo anti-CD40 no competitivo 5C3 se usarán para cuantificar el ensayo de ocupación del receptor.

Ejemplo 7: Actividad antitumoral del anticuerpo anti-CD40 humanizado

En algunos casos, puede ser conveniente determinar las propiedades antitumorales de los anticuerpos de la presente invención. Dicha determinación puede realizarse ensayando la actividad antitumoral del anticuerpo anti-CD40 humanizado en un modelo de xenotrasplante de linfoma de ratón SCID. A dicho modelo de SCID se le pueden inyectar células cancerosas para presentar un tumor, p. ej., 5×10^6 millones de células tumorales subcutáneamente en ratones SCID (10/grupo) trece días antes del comienzo del tratamiento con el fármaco. Los anticuerpos anti-CD40 murinos de la presente invención o una comparación (p. ej., control u otro anticuerpo humanizado) se administran por vía intraperitoneal 3 veces por semana (4 mg/kg/dosis) con 8 o 5 dosis administradas. El desarrollo y crecimiento de tumores se monitorea en el ratón, y el volumen del tumor se puede medir semanalmente durante el periodo de estudio seleccionado, p. ej., un periodo de estudio de 14 días. Preferiblemente, los resultados mostrarán un incremento de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces en el crecimiento de los tumores en ratones control comparados con los ratones tratados con los anticuerpos de la presente invención. Preferiblemente, durante el periodo de tratamiento, el crecimiento del tumor en los ratones tratados con los anticuerpos de la invención será insignificante. Dichos datos pueden corroborar que el anticuerpo humanizado ensayado es eficaz para suprimir el crecimiento tumoral en este modelo de xenoinjerto de linfoma B.

Ejemplo 8: Supervivencia prolongada por el anticuerpo anti-CD40 humanizado

La eficacia del anticuerpo anti-CD40 humanizado en la supervivencia de ratones que portan el tumor como aquellos anteriormente descritos se puede ensayar en un modelo de xenoinjerto de linfoma de ratón SCID. Los ratones SCID (10/grupo) se inoculan por vía intravenosa con 1×10^6 millones de células tumorales tres días antes del tratamiento con el anticuerpo. Los ratones luego se tratan con los anticuerpos anti-CD40 murinos o humanizados de la presente invención o con un control de Ig, administrado por vía intraperitoneal dos veces por semana (4 mg/kg/dosis) por un total de cinco dosis. Las jaulas de los ratones pueden examinarse diariamente para mortalidad a fin de determinar el nivel de eficacia de los anticuerpos para prolongar la supervivencia de un sujeto que padece cáncer.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Singh, Sanjaya
 Litzenburger, Tobias
 Brodeur, Scott
 5 Canada, Keith
 Barrett, Rachel

 <120> Anticuerpos Anti-CD40
 10 <130> 02950-22687US01

 <160> 78

 <170> PatentIn versión 3.5
 15
 <210> 1
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Secuencia VH de murino inicial CD40 de 2H11

 <400> 1
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

 Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

 Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

 Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

 Thr Leu Thr Val Ser Ser
 25 115

 <210> 2
 <211> 118
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia VH de murino inicial CD40 de 10F2

 35 <400> 2

ES 2 807 217 T3

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

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 3

<211> 118

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Secuencia VH de murino inicial CD40 de 19B10

<400> 3

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

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Phe Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

15

<210> 4

ES 2 807 217 T3

<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Secuencia VH de murino inicial CD40 de 20E2

<400> 4
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

10 <210> 5
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Secuencia VK de murino inicial CD40 de 2H11

<400> 5

ES 2 807 217 T3

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Gly Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

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

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

<210> 6
<211> 106
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Secuencia VK de murino inicial CD40 de 10F2

<400> 6
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Ile Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ala Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

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

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

15 <210> 7
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Secuencia VK de murino inicial CD40 de 19B10

ES 2 807 217 T3

<400> 7

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

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

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

- 5 <210> 8
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <223> Secuencia VK de murino inicial CD40 de 20E2

<400> 8

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

- 15 Lys
- <210> 9
- <211> 10
- <212> PRT
- 20 <213> Secuencia Artificial

ES 2 807 217 T3

<220>
 <223> Cadena pesada CDR1 de 2H11 y 19B10

5 <400> 9
 Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Val His
 1 5 10

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

15 <220>
 <223> Cadena pesada CDR1 de 10F2

<400> 10
 Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Ile His
 1 5 10

20 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Cadena pesada CDR1 de 20E2

<400> 11
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Met His
 1 5 10

30 <210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Cadena pesada CDR2 de 2H11

<400> 12
 Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
 1 5 10 15

40 Gly

<210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Cadena pesada CDR2 de 10F2

<400> 13
 Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
 1 5 10 15

50 Gly

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <213> Secuencia Artificial

ES 2 807 217 T3

<220>
 <223> Cadena pesada CDR2 de 19B10

<400> 14
 Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Phe Ala Pro Lys Phe Gln
 1 5 10 15

5 Gly

<210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cadena pesada CDR2 de 20E2

15 <400> 15
 Tyr Ile Ser Ser Gly Asn Arg Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 16
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cadena pesada CDR3 de 2H11, 10F2 y 19B10

25 <400> 16
 Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr
 1 5

<210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cadena pesada CDR3 de 20E2

35 <400> 17
 Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cadena ligera CDR1 de 2H11

<400> 18
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Leu
 1 5 10

50 <210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>

ES 2 807 217 T3

<223> Cadena ligera CDR1 de 10F2

<400> 19
Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Ile Leu
 1 5 10

5 <210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cadena ligera CDR1 de 19B10

<400> 20
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Leu
 1 5 10

15 <210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cadena ligera CDR1 de 20E2

25 <400> 21
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Thr

30 <210> 22
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Cadena ligera CDR2 de 2H11, 10F2 y 19B10

<400> 22
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

40 <210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Cadena ligera CDR2 de 20E2

<400> 23
Trp Thr Ser Thr Arg Glu Ser

50 1 5

55 <210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cadena ligera CDR3 de 2H11, 10F2, y 19B10

60 <400> 24

ES 2 807 217 T3

Gln Gln Arg Thr Phe Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 25
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cadena ligera CDR3 de 20E2

10 <400> 25
 Gln Asn Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr
 1 5

15 <210> 26
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cadena ligera de Anticuerpo A

<400> 26
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

ES 2 807 217 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 27
 <211> 449
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 10 <223> Cadena pesada IgG1K0 de Anticuerpo A

<400> 27
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

ES 2 807 217 T3

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Ala Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

ES 2 807 217 T3

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

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

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

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

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

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

Lys

<210> 28

<211> 449

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Cadena pesada IgG1 de Anticuerpo A

<400> 28

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

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

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

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

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

ES 2 807 217 T3

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Ala Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

ES 2 807 217 T3

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

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

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

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

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

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

Lys

<210> 29

<211> 446

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Cadena pesada IgG4DM de Anticuerpo A

<400> 29

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

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

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

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

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

ES 2 807 217 T3

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Ala Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

ES 2 807 217 T3

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 30
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cadena pesada IgG1K0b de Anticuerpo A

<400> 30
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

ES 2 807 217 T3

Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Ala Gln Gly
 100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

ES 2 807 217 T3

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

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

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

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

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

Lys

<210> 31

<211> 220

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Cadena ligera de Anticuerpo B

<400> 31

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

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

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

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

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

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

ES 2 807 217 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 32
 <211> 449
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 10 <223> Cadena pesada IgG1K0 de Anticuerpo B

<400> 32
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

ES 2 807 217 T3

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

ES 2 807 217 T3

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

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

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

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

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

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

Lys

<210> 33

<211> 449

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Cadena pesada IgG1 de Anticuerpo B

<400> 33

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

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

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

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

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

ES 2 807 217 T3

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

ES 2 807 217 T3

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

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

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

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

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

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

Lys

<210> 34

<211> 446

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Cadena pesada IgG4DM de Anticuerpo B

<400> 34

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

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

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

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

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

ES 2 807 217 T3

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

ES 2 807 217 T3

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 35

<211> 449

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Cadena pesada IgG1K0b de Anticuerpo B

<400> 35

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

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

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

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

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

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

ES 2 807 217 T3

Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

ES 2 807 217 T3

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

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

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

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

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

Lys

<210> 36

<211> 213

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Cadena ligera de Anticuerpo C

<400> 36

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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

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

ES 2 807 217 T3

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 37
 <211> 448
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 10 <223> Cadena pesada IgG1K0 de Anticuerpo C

<400> 37
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

Tyr Val His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

ES 2 807 217 T3

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 38
<211> 448
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Cadena pesada IgG1 de Anticuerpo C

<400> 38
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Tyr Val His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

ES 2 807 217 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 39
 <211> 445
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 10 <223> Cadena pesada IgG4DM de Anticuerpo C

<400> 39
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

Tyr Val His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

ES 2 807 217 T3

115	120	125																				
Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly							
130						135					140											
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn							
145					150					155					160							
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln							
				165					170					175								
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser							
			180					185					190									
Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser							
		195					200					205										
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys							
	210					215					220											
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu							
225					230					235					240							
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu							
				245					250					255								
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln							
			260					265					270									
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys							
		275					280					285										
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu							
	290					295					300											
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys							
305					310					315					320							
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys							
				325					330					335								
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser							
			340					345					350									
Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys							
		355					360					365										

ES 2 807 217 T3

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

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

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

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

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

<210> 40

<211> 448

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Cadena pesada IgG1K0b de Anticuerpo C

<400> 40

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

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

Tyr Val His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

ES 2 807 217 T3

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

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

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

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

<210> 41
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> Cadena ligera variable en ambos BI 655034 y BI 655035

10

<400> 41
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

Lys

<210> 42
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15

<220>
<223> Cadena pesada variable en ambos BI 655034 y BI 655035

20

<400> 42

ES 2 807 217 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 43

<211> 113

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Cadena ligera variable en ambos BI 655036 y Anticuerpo A

<400> 43

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

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

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

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

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

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

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

Lys

15

<210> 44

<211> 119

ES 2 807 217 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 5 <223> Cadena pesada variable en ambos BI 655036 y Anticuerpo A

<400> 44
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Asn Arg Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Ala Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

10 <210> 45
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Cadena ligera variable en ambos BI 655038 y BI 655039
 <400> 45

ES 2 807 217 T3

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

Glu Lys Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

Lys

<210> 46

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Cadena pesada variable en ambos BI 655038 y BI 655039

<400> 46

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

15 <210> 47
<211> 113

ES 2 807 217 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Cadena ligera variable en ambos BI 655040 y BI 655041

<400> 47
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

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

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

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

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

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

Lys

10 <210> 48
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Cadena pesada variable en ambos BI 655040 y BI 655041

<400> 48

ES 2 807 217 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 49
<211> 113
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Cadena ligera variable en ambos BI 655042 y BI 655043

<400> 49
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

Lys

15 <210> 50
<211> 119

ES 2 807 217 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Cadena ligera variable en ambos BI 655042 y BI 655043

<400> 50
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Arg Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Asn Arg Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

10 <210> 51
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Cadena ligera variable en ambos BI 655044 y BI 655045

<400> 51

ES 2 807 217 T3

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

Glu Lys Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

Lys

<210> 52

<211> 113

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Cadena ligera variable en ambos BI 655046 y Anticuerpo B

<400> 52

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

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

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

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

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

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

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

Lys

15 <210> 53
<211> 119

ES 2 807 217 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 5 <223> Cadena pesada variable en cada uno de BI 655044, BI 655045, BI 655046 y Anticuerpo B

<400> 53
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Asn Arg Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

10 <210> 54
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Cadena ligera variable en BI 655052

<400> 54

ES 2 807 217 T3

Gln 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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 55

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera variable en cada uno de BI 655053, BI 655055, BI 655057, BI 655059 y BI 655061

<400> 55

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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 56

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera variable en cada unode BI 655054, Anticuerpo B, BI 655058, BI 655060 y BI 655062

ES 2 807 217 T3

<400> 56

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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

- 5 <210> 57
- <211> 118
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <223> Cadena pesada variable en cada uno de BI 655052, BI 655053 y BI 655054

<400> 57

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

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

- 15 Leu Val Thr Val Ser Ser
115

- <210> 58
- <211> 118
- <212> PRT

ES 2 807 217 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena pesada variable en ambos BI 655055 y Anticuerpo C

5

<400> 58

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

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

Tyr Val His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

10

<210> 59

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Cadena pesada variable en ambos BI 655057 y BI 655058

<400> 59

ES 2 807 217 T3

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

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 60
<211> 118
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Cadena pesada variable en ambos BI 655059 y BI 655060

<400> 60
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

15 <210> 61

ES 2 807 217 T3

<211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Cadena pesada variable en ambos BI 655061 y BI 655062

<400> 61
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

Tyr Val His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

10 Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 62
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Secuencia pesada variable Versión 1 de Anticuerpo 19B10-Hum

20 <400> 62

ES 2 807 217 T3

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

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Phe Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 63

<211> 118

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Secuencia pesada variable Versión 2 de Anticuerpo 19B10-Hum

<400> 63

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

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Phe Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

15

<210> 64

ES 2 807 217 T3

<211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Secuencia pesada variable Versión 3 de Anticuerpo 19B10-Hum

<400> 64
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Phe Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

10 Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 65
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Secuencia pesada variable Versión 4 de Anticuerpo 19B10-Hum

20 <400> 65

ES 2 807 217 T3

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

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

Tyr Val His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Phe Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 66
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia pesada variable Versión 5 de Anticuerpo 19B10-Hum

<400> 66
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

Tyr Val His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Phe Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 67

ES 2 807 217 T3

<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Secuencia pesada variable Versión 1 de Anticuerpo 10F2Hum

<400> 67
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

10 Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 68
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Secuencia pesada variable Versión 2 de Anticuerpo 10F2Hum

20 <400> 68

ES 2 807 217 T3

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 69

<211> 118

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Secuencia pesada variable Versión 3 de Anticuerpo 10F2Hum

<400> 69

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

15

<210> 70

ES 2 807 217 T3

<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Secuencia pesada variable Versión 4 de Anticuerpo 10F2Hum

<400> 70
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

10 Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 71
<211> 118
15 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia pesada variable Versión 5 de Anticuerpo 10F2Hum

20 <400> 71

ES 2 807 217 T3

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 72
<211> 118
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Secuencia pesada variable Versión 6 de Anticuerpo 10F2Hum

<400> 72
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

15 <210> 73

ES 2 807 217 T3

<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Secuencia pesada variable Versión 7 de Anticuerpo 10F2Hum

<400> 73
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

10 Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 74
<211> 106
15 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia ligera variable Versión 1 de Anticuerpo 10F2Hum

20 <400> 74

ES 2 807 217 T3

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 Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 75
<211> 106
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Secuencia ligera variable Versión 2 de Anticuerpo 10F2Hum

<400> 75
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 Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

15 <210> 76
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Secuencia ligera variable Versión 3 de Anticuerpo 10F2Hum

ES 2 807 217 T3

<400> 76

Gln 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 Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

- 5 <210> 77
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <223> Cadena pesada CDR3 para 2H11, 10F2 y 19B10

<400> 77

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

- 15 <210> 78
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- 20 <220>
- <223> Cadena pesada CDR3 para 20E2

<400> 78

Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

25

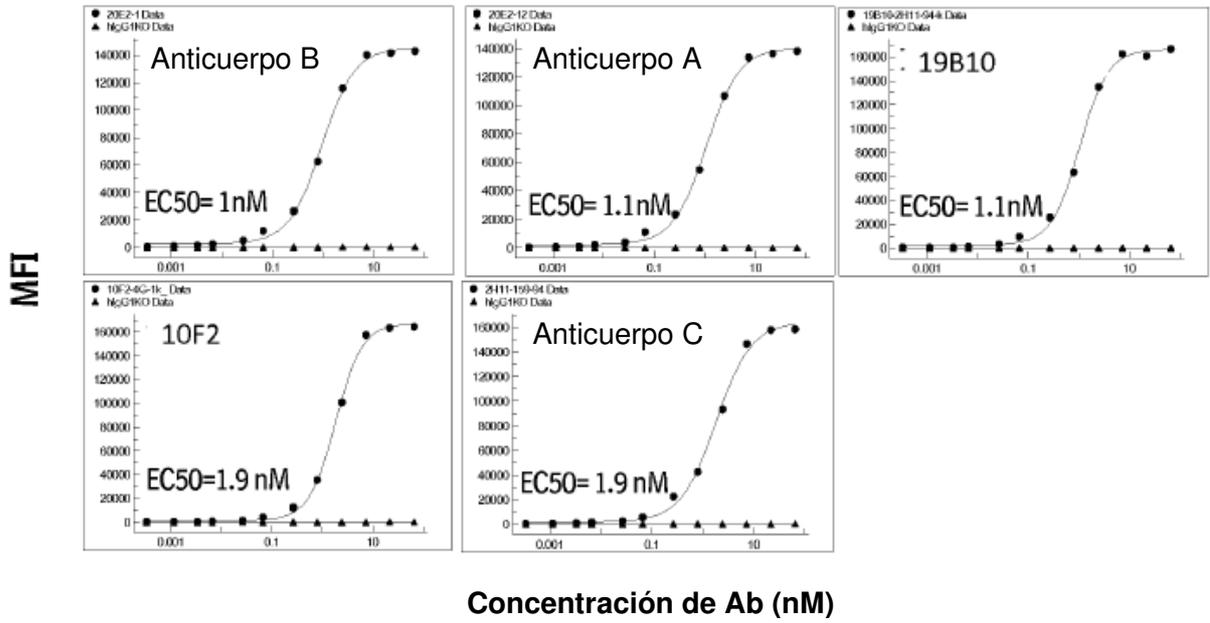
REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-CD40 humanizado que tiene una cadena pesada variable y una cadena ligera variable que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 52, respectivamente, donde el anticuerpo comprende una región Fc de inmunoglobulina humana y en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG1.
- 5 2. El anticuerpo anti-CD40 humanizado según la reivindicación 1 que tiene una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 35.
3. El anticuerpo anti-CD40 humanizado según la reivindicación 1 o 2, donde el anticuerpo tiene una mutación Leu234Ala y Leu235Ala en la región Fc.
- 10 4. El anticuerpo anti-CD40 humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para uso en el tratamiento o mejora de una enfermedad o trastorno en un mamífero.
5. El anticuerpo anti-CD40 humanizado para uso como en la reivindicación 4, donde la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en: enfermedad injerto frente huésped, enfermedad autoinmune o inflamatoria y cáncer que expresa CD40.
- 15 6. El anticuerpo anti-CD40 humanizado para uso como en la reivindicación 5, en donde la enfermedad autoinmune o inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, esclerosis múltiple, glomerulonefritis proliferativa por lupus, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), psoriasis, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), enfermedad de Crohn y lupus eritematoso sistémico (LES), tiroiditis de Hashimoto, mixoedema primario, tirotoxicosis/enfermedad de Graves, anemia perniciosa, gastritis atrófica autoinmune, carditis autoinmune,
- 20 enfermedad de Addison, menopausia prematura, diabetes mellitus tipo 1, síndrome de Goodpasture, miastenia gravis, anemia hemolítica autoinmune, leucopenia idiopática, cirrosis biliar primaria, hepatitis crónica activa (HBs Ag negativo), cirrosis criptogénica, síndrome de Sjogren, dermatomiositis, esclerodermia, enfermedad conectiva de los tejidos mixtos, lupus eritematoso discoide y vasculitis sistémica.
- 25 7. El anticuerpo anti-CD40 humanizado para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, para uso con un segundo agente terapéutico.
8. El anticuerpo anti-CD40 humanizado para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 4-7, donde dicho anticuerpo se administra por vía parenteral, vía intravenosa o vía de administración subcutánea.
9. Una composición farmacéutica que comprende: (i) el anticuerpo anti-CD40 humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3; y (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable; y donde el anticuerpo se conjuga
- 30 opcionalmente con un segundo agente.
10. Polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia que codifica un anticuerpo anti-CD40 humanizado que tiene la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 53 y la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 52, donde el anticuerpo comprende una región Fc de inmunoglobulina humana y donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG1.

35

FIGURA 1

A.



B.

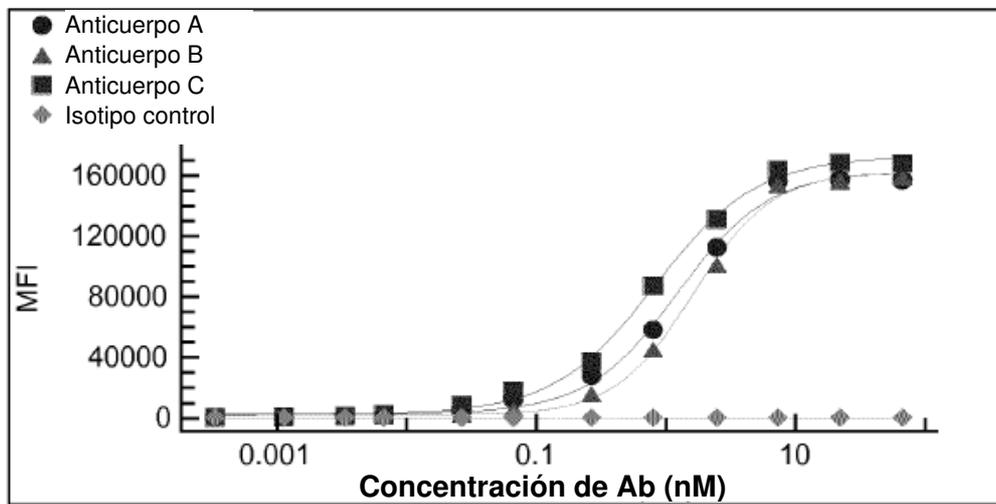


FIGURA 2

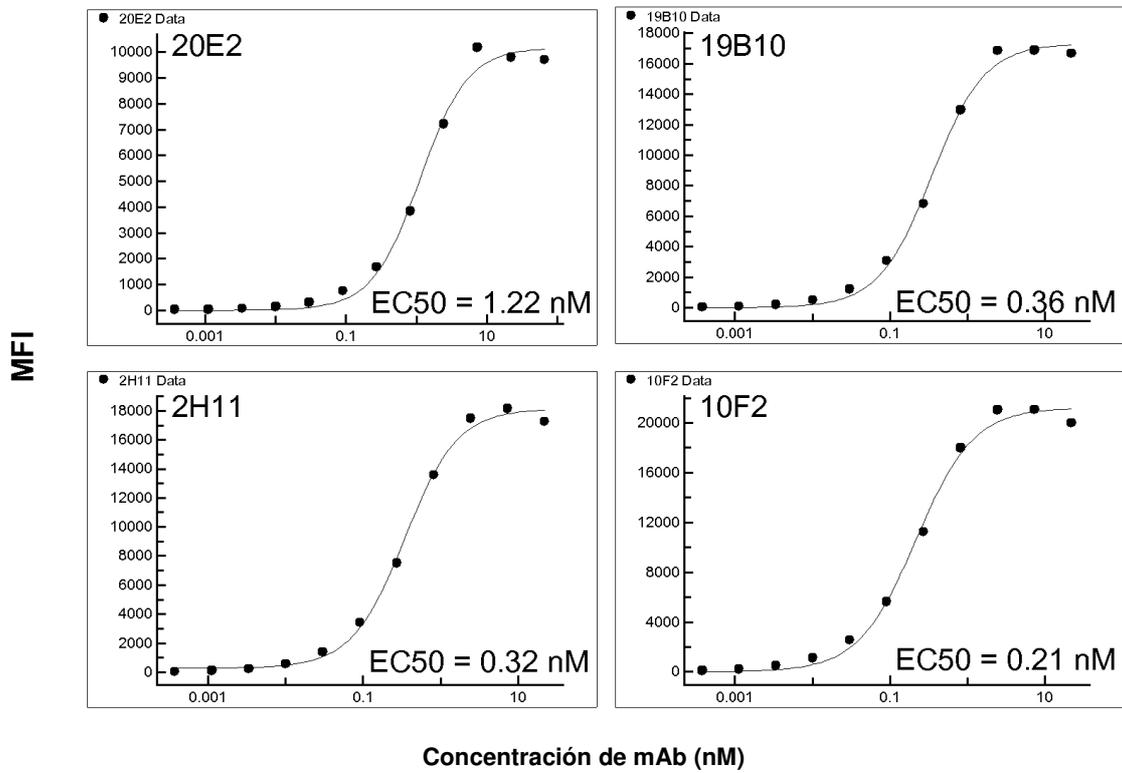
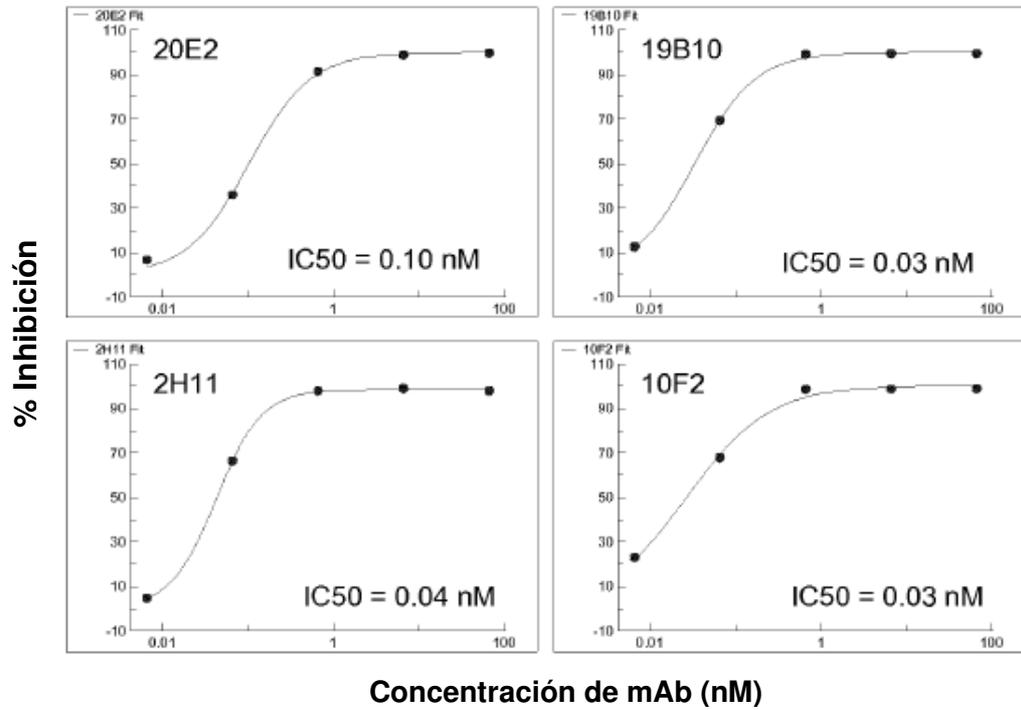


FIGURA 3

A.



B.

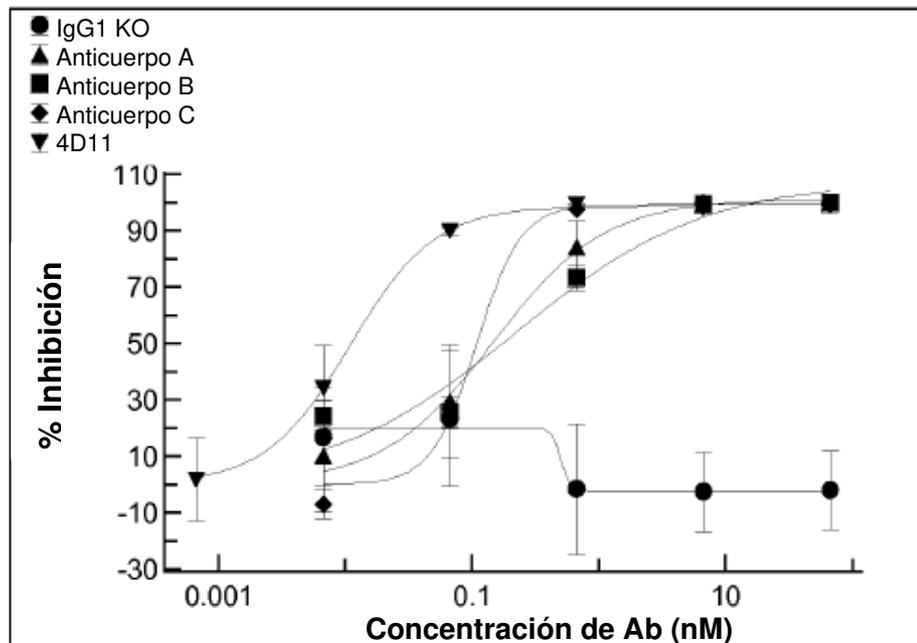


FIGURA 4

Ensayo de proliferación de células B humanas			
		Antagonismo	Agonismo
Nombre de Ab	Isotipo	Media IC50 nM±SEM (n)	SI ±SEM (n)
Anticuerpo B	hlgG1KO	0.2±0.09 (n=3)	1±0.3 (n=3)
Anticuerpo A	hlgG1KO	0.3±0.03 (n=3)	1±0.13 (n=3)
Anticuerpo C	hlgG1KO	0.1±0.01 (n=3)	1±0.06 (n=3)
10F2	hlgG1KO	0.8±0.11 (n=3)	1±0.09 (n=3)
4D11	hlgG4DM	0.02±0.01 (n=3)	1±0.11 (n=3)
G28.5	mlgG1	NT	7±1.94 (n=3)
mu5D12	hlgG4Pro	Sin inhibición hasta 67nM	18±3.1 (n=3)

NT=no analizado

FIGURA 5

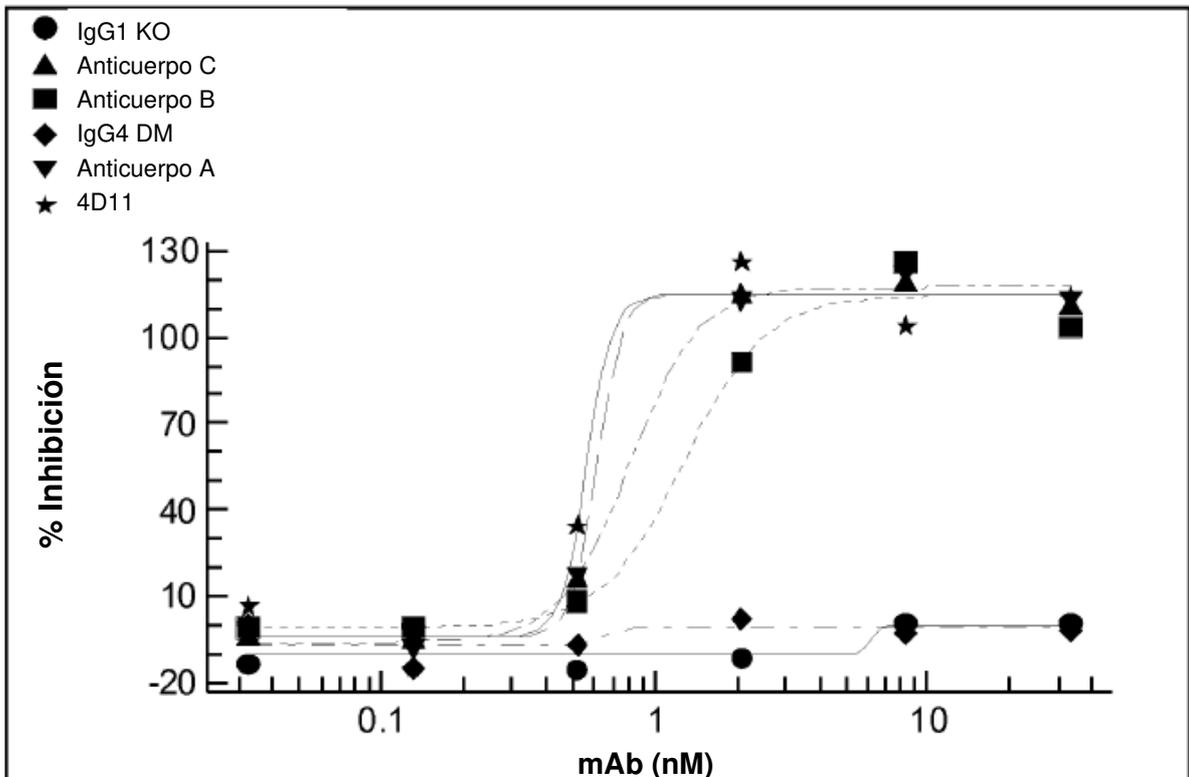


FIGURA 6

A.

mAB (isotipo)	IC50 (nM +/- SEM)		Nº de cambios
	Cél. B purificadas	HWB	
Anticuerpo B	0.6 +/- 0.3 (n=4)	1.3 +/- 0.7(n=4)	2.2
4D11 (hIgG4 DM)	0.03 +/- 0.01 (n=5)	0.6 +/- 0.3 (n=4)	20.0

B.

mAB (isotipo)	IC90 (nM +/- SEM)		Nº de cambios
	Cél. B purificadas	HWB	
Anticuerpo B	5.3 +/- 2.4 (n=4)	4.3 +/- 2.1 (n=4)	0.8
4D11 (hIgG4 DM)	0.05 +/- 0.02 (n=5)	1.3 +/- 0.64 (n=4)	26

FIGURA 7

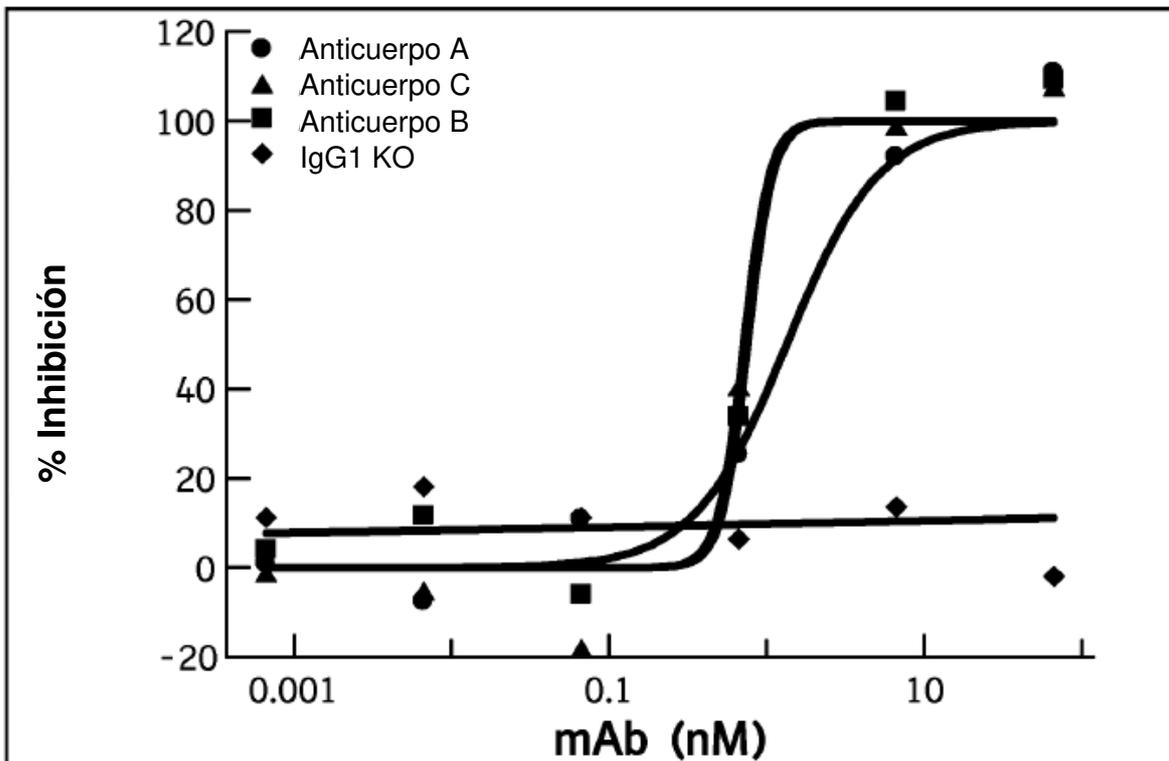


FIGURA 8

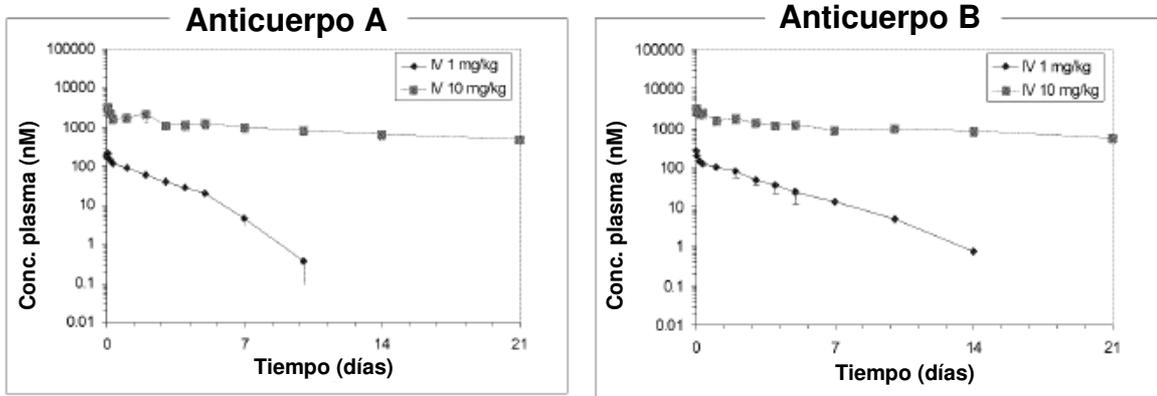


FIGURA 9

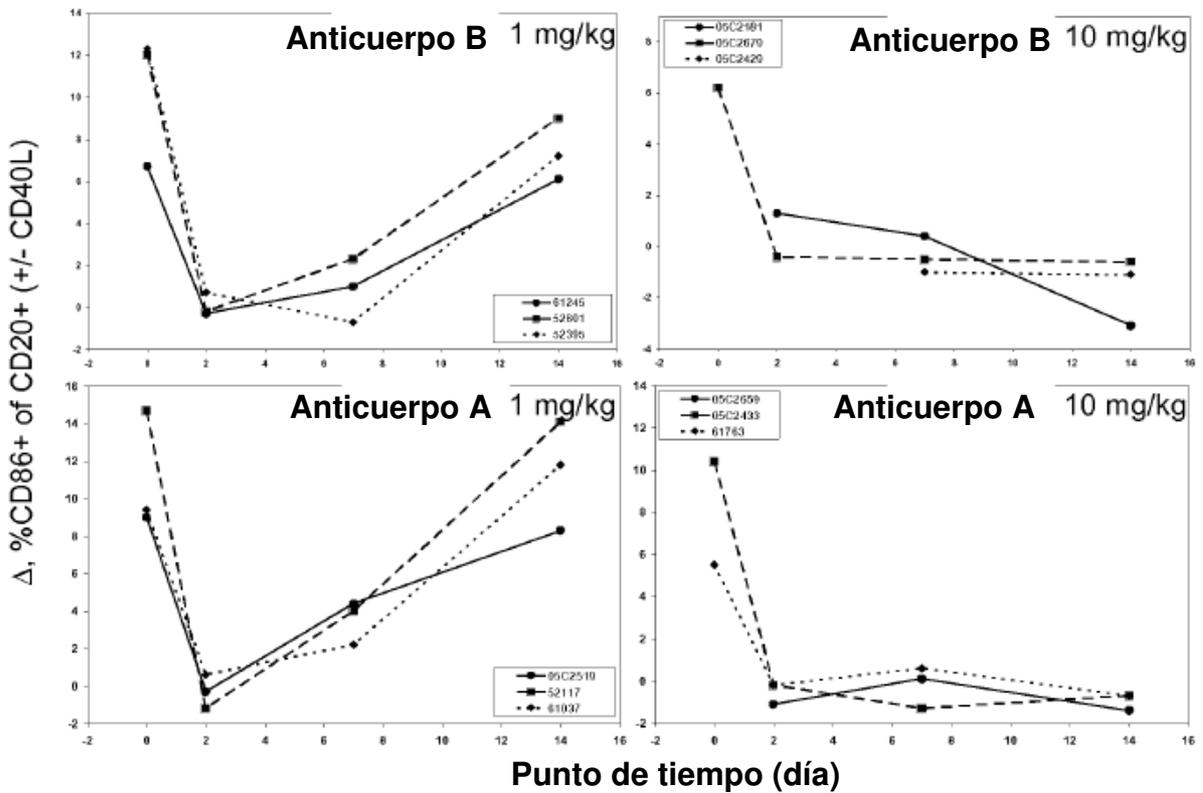
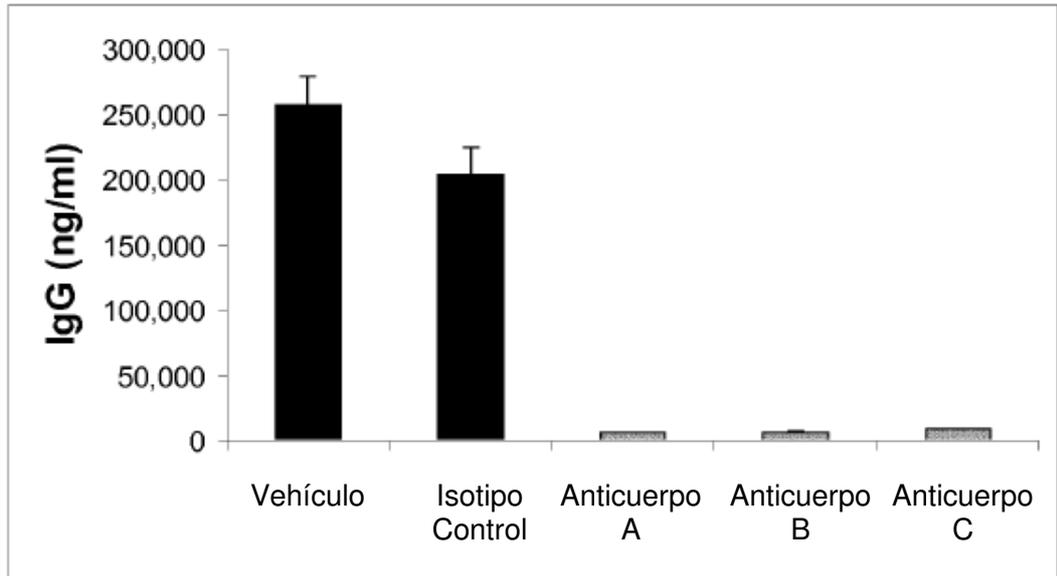


FIGURA 10

A.



B.

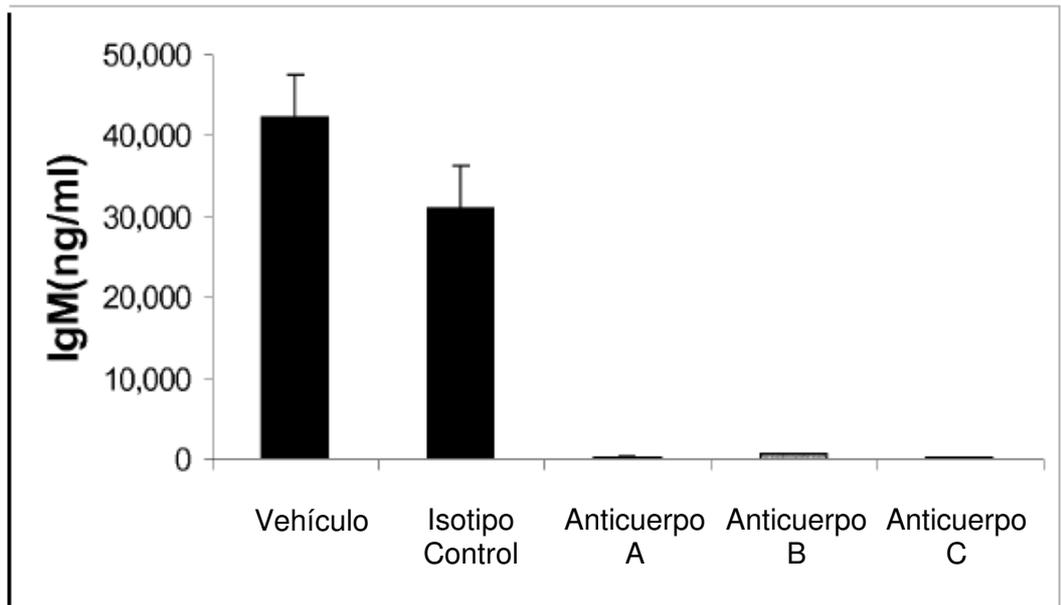


FIGURA 11

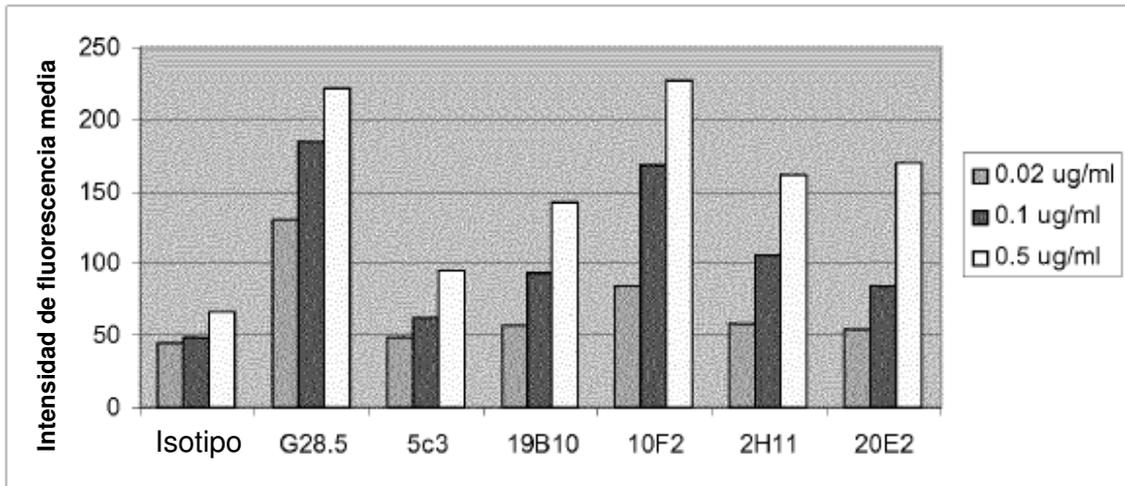


FIGURA 12

	EC50 nM (intervalo)	
	Anticuerpo B	4D11
Células B		
Humanas (n = 6)	1.8 (1.2 to 2.3)	0.3 (0.1 to 0.3)
Cynomolgus (n = 5)	2.1 (1.4 to 2.9)	0.7 (0.6 to 0.8)
Plaquetas		
Humanas (n = 5)	4.6 (2.5 to 5.8)	0.7 (0.4 to 0.9)
Cynomolgus (n = 5)	3.9 (2.7 to 6.2)	1.2 (0.9 to 1.7)

FIGURA 13

