

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 973 062**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61K 38/13 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2012** **E 19156093 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2024** **EP 3556774**

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

30 Prioridad:

11.03.2011 US 201161451870 P

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

18.06.2024

73 Titular/es:

**BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER
INC. (50.0%)**

**330 Brookline Avenue,
Brookline, MA 02215, US y
EMORY UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

MORENO NOGALES, Ángeles

ES 2 973 062 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-CD40 y usos de los mismos

5 **Antecedentes de la invención**

La invención se refiere a composiciones farmacéuticas como se especifica mediante las reivindicaciones que comprenden anticuerpos anti-CD40 humanizados y usos de dichos anticuerpos, por ejemplo, para reducir la probabilidad de, o incrementar el periodo de tiempo antes de, el rechazo del trasplante, para inducir inmunosupresión o para tratar un trastorno autoinmunitario.

Boon L. et al. (Preclinical assessment of anti-CD40 Mab 5D12 in cynomolgus monkeys; Toxicology, 2002;174(1):53-65) divulga la evaluación preclínica del anticuerpo quimérico anti-CD40 ch5D12. La supresión del sistema inmunitario, en particular el sistema inmunitario humoral, es beneficiosa en el trasplante de órganos y el tratamiento de trastornos autoinmunitarios. El trasplante de órganos, por ejemplo, se ha convertido en un procedimiento de tratamiento preferente para muchas formas de enfermedades potencialmente mortales que implican daño orgánico. Se produce rechazo del trasplante cuando un organismo que recibe células o tejido trasplantados genera una respuesta inmunitaria no deseada a ese tejido. El rechazo del trasplante se puede minimizar mediante la compatibilidad del tipo de tejido, pero el donante rechaza, en general, incluso el tejido compatible. Por tanto, los tratamientos inmunosupresores se requieren para prácticamente todos los casos de trasplante de tejidos.

Se han logrado mejores resultados en el trasplante clínico, principalmente a través del desarrollo de fármacos inmunosupresores inespecíficos cada vez más potentes para inhibir las respuestas de rechazo. Si bien los resultados a corto plazo han mejorado, los resultados a largo plazo siguen siendo inadecuados. Puede ser necesario administrar agentes inmunosupresores de por vida para combatir el rechazo crónico del órgano trasplantado, y el uso de estos agentes incrementa drásticamente los riesgos de cardiopatías, infecciones y neoplasias malignas.

Un objetivo potencial para reducir el rechazo de los trasplantes es la interacción CD40/CD154. CD40 se expresa en la superficie de los linfocitos B y CD154 se expresa en la superficie de los linfocitos T. La interacción entre estas dos proteínas se asocia con la activación de linfocitos B, que desencadena la expresión de citocinas, así como la expresión de marcadores de superficie celular, incluyendo CD23, CD80 y CD86. Se ha demostrado que el bloqueo de esta interacción usando anticuerpos anti-CD154 reduce o elimina el rechazo de tejidos trasplantados en primates no humanos.

Para cualquier tipo de inmunosupresión (por ejemplo, en un procedimiento de trasplante), el equilibrio entre eficacia y toxicidad es un factor clave para su aceptación clínica. Por tanto, existe una necesidad de tratamientos que se dirijan específicamente a las vías inmunológicas implicadas en, por ejemplo, el rechazo del trasplante y los trastornos autoinmunitarios.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humanizado aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a CD40 que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la totalidad de las regiones hipervariables correspondientes a las expuestas en los aminoácidos 20-132 de SEQ ID. NO:2 y una región variable de la cadena ligera que comprende todas las regiones hipervariables correspondientes a las expuestas en los aminoácidos 23-128 de SEQ ID NO:4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo bloquea la activación de linfocitos B por células Jurkat que expresan CD154 *in vitro* en la que el anticuerpo humanizado o el fragmento de unión a antígeno del mismo se humaniza usando el procedimiento de mejor ajuste para regiones hipervariables y regiones estructurales humanas como se describe en Sims et al., J. Immunol. 151: 2296-308, 1993 o Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-17, 1987, así como a usos de la misma.

Se divulga un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, un anticuerpo que carece de una porción Fc o es un F(ab')₂, un Fab, un Fv o una estructura scFv), que se une específicamente a un epítipo presente en CD40 (por ejemplo, CD40 de macaco de la India, murino o humano), donde el epítipo es reconocido por el anticuerpo 2C10 (por ejemplo, donde dicho epítipo no es reconocido por el anticuerpo 3A8 o el Chi220, o por ninguno de los dos). El anticuerpo puede ser capaz de bloquear la activación de linfocitos B (por ejemplo, linfocitos B de macaco de la India o humanos) mediante células Jurkat que expresan CD154 *in vitro*. Preferentemente, el anticuerpo es capaz de inhibir linfocitos B de macaco de la India *in vitro*, por ejemplo, reduciendo la expresión de CD23, CD80 o CD86. Se divulga que el anticuerpo puede ser el anticuerpo 2C10. El anticuerpo puede tener regiones constantes humanas. El anticuerpo en la composición farmacéutica es un anticuerpo humanizado. En una divulgación, el anticuerpo es un anticuerpo humano. Se divulga que el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal.

Se divulga que el anticuerpo incluye la región variable de la cadena pesada definida por los aminoácidos 20-132 de SEQ ID NO:2, o una porción de unión al anticuerpo o fragmento del mismo. El anticuerpo en la composición farmacéutica de la invención incluye una forma humanizada de la región variable de la cadena pesada definida por los aminoácidos 20-132 de SEQ ID NO:2, como se especifica en las reivindicaciones. En otra divulgación, la región variable de la cadena ligera del anticuerpo incluye la secuencia de 23-128 de SEQ ID NO:4, o una porción de unión al anticuerpo o fragmento del mismo. El anticuerpo en la composición farmacéutica de la invención incluye una forma humanizada de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que incluye la secuencia de 23-128 de SEQ ID NO:4, como se especifica en las reivindicaciones. En otra divulgación, la región variable de la cadena pesada del anticuerpo incluye los aminoácidos 20-132 de SEQ ID NO:2 y la secuencia variable de la cadena ligera del anticuerpo incluye los aminoácidos 23-128 de SEQ ID NO:4.

También se divulga un polinucleótido que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la composición farmacéutica de la invención, un vector que incluye el polinucleótido y una célula que incluye el vector. La célula puede ser eucariota (por ejemplo, de mamífero, tal como una célula de humano, ratón, mono o conejo) o puede ser procarionota (por ejemplo, una célula bacteriana tal como una célula de *E. coli*).

Cualquier referencia en la descripción a procedimientos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante tratamiento.

Se divulga un procedimiento de supresión del sistema inmunitario en un sujeto (por ejemplo, un mamífero, tal como un humano). El procedimiento incluye administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la divulgación al sujeto.

Se divulga un procedimiento de tratamiento o tratamiento profiláctico del rechazo del trasplante o de incremento del periodo de tiempo antes de que se produzca el rechazo del trasplante en un sujeto (por ejemplo, un mamífero, tal como un humano) que lo necesita. El procedimiento incluye administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la divulgación al sujeto.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica de la presente invención para su uso en la supresión del sistema inmunitario en un sujeto.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento o tratamiento profiláctico del rechazo del trasplante o el incremento del periodo de tiempo antes de que se produzca el rechazo del trasplante en un sujeto que lo necesita.

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

Se divulga un procedimiento de tratamiento o tratamiento profiláctico de la enfermedad de injerto contra huésped en un sujeto (por ejemplo, un mamífero, tal como un humano) que lo necesita. El procedimiento incluye administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, al sujeto.

Aún en otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención para su uso en un procedimiento de tratamiento o tratamiento profiláctico de la enfermedad de injerto contra huésped en un sujeto que lo necesita.

Se divulga un procedimiento de tratamiento o tratamiento profiláctico de un trastorno autoinmunitario en un sujeto (por ejemplo, un mamífero, tal como un humano) que lo necesita. Aún en otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención para su uso en un procedimiento de tratamiento o tratamiento profiláctico de un trastorno autoinmunitario en un sujeto que lo necesita. El uso incluye administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención al sujeto. En determinados modos de realización, el trastorno autoinmunitario está asociado con o causado por la presencia de un autoanticuerpo (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome CREST (calcinosis, síndrome de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), opsoclonía, miopatía inflamatoria (por ejemplo, polimiositis, dermatomiositis y miositis por cuerpos de inclusión), esclerodermia sistémica, cirrosis biliar primaria, enfermedad celíaca (por ejemplo, enteropatía sensible al gluten), dermatitis herpetiforme, síndrome de Miller-Fisher, neuropatía axonal motora aguda (NAMA), neuropatía motora multifocal con bloqueo de la conducción, hepatitis autoinmunitaria, síndrome antifosfolípido, granulomatosis de Wegener, poliangeitis microscópica, síndrome de Churg-Strauss, artritis reumatoide, hepatitis autoinmunitaria crónica, escleromiositis, miastenia grave, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves,

degeneración cerebelosa paraneoplásica, síndrome de la persona rígida, encefalitis límbica, síndrome de Isaacs, corea de Sydenham, trastorno neuropsiquiátrico autoinmunitario pediátrico asociado con Streptococcus (PANDAS), encefalitis, diabetes de tipo 1 y neuromielitis óptica). En otros modos de realización, el trastorno se selecciona del grupo que consiste en anemia perniciosa, enfermedad de Addison, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis psoriásica, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso (por ejemplo, lupus eritematoso discoide, lupus eritematoso inducido por fármacos y lupus eritematoso neonatal), esclerosis múltiple y artritis reactiva. Todavía en otros modos de realización, el trastorno se selecciona del grupo que consiste en polimiositis, dermatomiositis, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, uveítis autoinmunitaria, adrenalitis, tiroiditis, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, atrofia gástrica, hepatitis crónica, hepatitis lupoides, aterosclerosis, demencia presenil, enfermedades desmielinizantes, lupus eritematoso cutáneo subagudo, hipoparatiroidismo, síndrome de Dressler, trombocitopenia autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica, pénfigo vulgar, pénfigo, alopecia areata, penfigoide, esclerodermia, esclerosis sistémica progresiva, diabetes de inicio en la edad adulta (por ejemplo, diabetes de tipo II), infertilidad masculina y femenina autoinmunitaria, espondilitis anquilosante, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, poliarteritis nodosa, vasculitis necrosante sistémica, artritis reumatoide de aparición juvenil, glomerulonefritis, dermatitis atópica, rinitis atópica, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Chagas, sarcoidosis, fiebre reumática, asma, aborto recurrente, síndrome antifosfolípido, neumopatía del granjero, eritema multiforme, síndrome poscardiotomía, síndrome de Cushing, hepatitis activa crónica autoinmunitaria, neumopatía de los avicultores, enfermedad alérgica, encefalomielitis alérgica, necrólisis epidérmica tóxica, alopecia, síndrome de Alport, alveolitis, alveolitis alérgica, alveolitis fibrosante, enfermedad pulmonar intersticial, eritema nudoso, piodermia gangrenosa, reacción a transfusión, lepra, malaria, leishmaniosis, tripanosomiasis, arteritis de Takayasu, polimialgia reumática, arteritis temporal, esquistosomiasis, arteritis de células gigantes, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, eccema, granulomatosis linfomatoide, enfermedad de Behcet, síndrome de Caplan, enfermedad de Kawasaki, dengue, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, endoftalmítis, eritema elevado persistente y diutino, eritroblastosis fetal, fascitis eosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, filariasis, ciclitis, ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, ciclitis de Fuch, nefropatía por IgA, púrpura de Henoch-Schonlein, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo del trasplante, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, infección por ecovirus, miocardiopatía, enfermedad de Alzheimer, infección por parvovirus, infección por el virus de la rubéola, síndromes posvacunación, infección congénita por el virus de la rubéola, linfoma de Hodgkin y no hodgkiniano, carcinoma de células renales, mieloma múltiple, síndrome de Eaton-Lambert, policondritis recidivante, melanoma maligno, crioglobulinemia, macroglobulinemia de Waldenstrom, infección por el virus de Epstein-Barr, paperas, síndrome de Evan e insuficiencia gonadal autoinmunitaria.

En cualquiera de los tres aspectos previos, la administración podrá ser parenteral, intravenosa, subcutánea, oral, tópica, intratecal, local o por cualquier vía descrita en el presente documento.

En cualquiera de los cuatro aspectos previos, el uso puede incluir además la administración de un segundo agente dentro de los seis meses (por ejemplo, dentro de 3, 2 o 1 meses; dentro de 4, 3, 2 o 1 semanas; dentro de 6, 5, 4, 3, 2 o 1 días; o dentro de 18, 12, 6, 3, 2 o 1 horas después de la administración del anticuerpo), donde el segundo agente es un inmunosupresor. El segundo agente se puede seleccionar del grupo que consiste en un inhibidor de la calcineurina (por ejemplo, ciclosporina A o ciclosporina G), tacrólimus, un inhibidor de mTor (por ejemplo, sirólimus, temsirólimus, zotarólimus o everólimus), fingolimod, miriocina, alemtuzumab, rituximab, un anticuerpo monoclonal anti-CD4, un anticuerpo monoclonal anti-LFA1, un anticuerpo monoclonal anti-LFA3, un anticuerpo anti-CD45 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CDR5RB), un anticuerpo anti-CD19, monabatacept, belatacept, indolil-ASC, azatioprina, inmunoglobulina linfocitaria y globulina antitímocítica [equina], micofenolato mofetilo, micofenolato de sodio, daclizumab, basiliximab, ciclofosfamida, prednisona, prednisolona, leflunomida, FK778, FK779, 15-desoxiespergualina, busulfano, fludarabina, metotrexato, 6-mercaptopurina, 15-desoxiespergualina, LF15-0195, bredinina, brequinar y muromonab-CD3. En determinados modos de realización, el segundo agente es belatacept.

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

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

el presente documento y una secuencia heteróloga.

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

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

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En un modo de realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los residuos de una región hipervariable (HVR) del receptor se reemplazan por residuos de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseada. En algunos casos, los residuos estructurales (FR) (es decir, residuos en las regiones variables distintas de las regiones hipervariables) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se pueden realizar para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado puede comprender sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana, y todos o sustancialmente todos los FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para otros detalles, véase, por ejemplo, Jones et al., *Nature* 321:522-25, 1986; Riechmann et al., *Nature* 332:323-29, 1988; y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-6, 1992. Véase también, por ejemplo, Vaswani et al., *Ann. Allergy Asthma & Immunol.* 1:105-15, 1998; Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-8, 1995; Hurlle et al., *Curr. Op. Biotech.* 5:428-33, 1994; y las patentes de EE. UU. n.º 6.982.321 y 7.087.409.

Un "anticuerpo humano" es aquel que posee una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de un anticuerpo producido por un humano y/o se ha elaborado usando cualquiera de las técnicas para elaborar anticuerpos humanos como se divulga en el presente documento. Esta definición de anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluidas colecciones de presentación en fagos (Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.* 227:381-8, 1992; Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-97, 1991). También están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos procedimientos descritos en Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer et al., *J. Immunol.* 147:86-95, 1991. Véase también van Dijk et al., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74, 2001. Los anticuerpos humanos se pueden preparar administrando el antígeno a un animal transgénico que ha sido modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta al desafío antigénico, pero cuyos locus endógenos se han desactivado, por ejemplo, xenoratonos inmunizados (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a la tecnología Xenomouse®). Véase también, por ejemplo, Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:3557-62, 2006 con respecto a anticuerpos humanos generados por medio de una tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos. Por "tratar" una enfermedad, trastorno o afección en un sujeto se entiende reducir al menos un síntoma de la enfermedad, trastorno o afección mediante la administración de un agente terapéutico al sujeto.

Por "tratar profilácticamente" una enfermedad, trastorno o afección en un sujeto se entiende reducir la frecuencia de aparición o gravedad de (por ejemplo, prevenir) una enfermedad, trastorno o afección mediante la administración al sujeto de un agente terapéutico al sujeto antes de la aparición de un síntoma o síntomas de la enfermedad.

El término "una cantidad eficaz" quiere decir la dosis necesaria para tratar eficazmente los efectos fisiológicos de una afección médica (por ejemplo, rechazo de un trasplante o enfermedad de injerto contra huésped).

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

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

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

Breve descripción de los dibujos

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

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

15 La **figura 2a** es una curva que muestra datos de citometría de flujo que confirman la unión de 2C10 a linfocitos B CD20+ humanos y de macaco de la India.

20 La **figura 2b** es una curva que muestra datos de adsorción de CD40 de ensayos ELISA con concentraciones variables de 2C10 para confirmar la unión de 2C10 a CD40 humano y de macaco de la India detectada usando anti-IgG-HRP de ratón de cabra.

25 La **figura 3** es una curva que muestra la inhibición dependiente de la dosis de la unión de CD154 a linfocitos B mediante 2C10. Los linfocitos B se analizaron para determinar la unión de CD154 mediante incubación con CD154 soluble marcado con histidina y análisis de la expresión de histidina. Los resultados son representativos de múltiples repeticiones del experimento.

30 La **figura 4** es un diagrama esquemático y gráficos que muestran el principio del ensayo que implica leucocitos monomorfonucleares en sangre periférica (PBMC) de macaco de la India o humanos y células Jurkat.

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

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

45 La **figura 7** es un conjunto de gráficos que muestran la expresión de CD23 en células CD20+ tomadas de PBMC humanos o de macaco de la India cultivados sin células Jurkat en presencia del anticuerpo 3A8 o bien del 2C10.

50 La **figura 8** es un gráfico que muestra el recuento de linfocitos B periféricos de macacos de la India tratados con formas quiméricas ratón-macaco de la India de 2C10 genomanipuladas para contener regiones constantes de la cadena pesada de IgG1 (2C10R1) o IgG4 (2C10R4) de macaco de la India, y formas quiméricas de IgG1 de anti-CD40 3A8 (3A8R1) o anti-CD40 Chi220 (Chi220). Todos los animales fueron inmunizados con hemocianina de lapa californiana (KLH) conjugada con 4-hidroxi-3-nitrofenilacetilo después del primer tratamiento con anticuerpos.

55 La **figura 9** es un gráfico que muestra respuestas de anticuerpos dependientes de linfocitos T en macacos tratados con anticuerpo 2C10R1, 2C10R4 o 3A8R1. Todos los animales fueron inmunizados con KLH después del primer tratamiento con anticuerpos.

60 La **figura 10** es un diagrama que muestra el modelo de macaco estándar de trasplante alogénico de islotes. Se indujo diabetes en macacos usando estreptozotocina. Los monos diabéticos se sometieron a trasplante con islotes alogénicos e inmunosupresión iniciada con basiliximab y sirólimus. Los animales de experimentación recibieron tratamiento con 2C10R4 los días 0 y 7 después del trasplante.

65 La **figura 11a** es una curva que muestra los niveles de glucosa libre en sangre (FBG) en 4 macacos después del trasplante de islotes, la inmunosupresión de base y el tratamiento con 2C10R4. La línea continua en la curva representa el nivel de 2C10 en el plasma.

La **figura 11b** es una curva que muestra la FBG en macacos que recibieron solo inmunosupresión de base.

La **figura 12** es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de bloqueo competitivo usando PBMC humanos incubados con concentraciones crecientes de anticuerpos 2C10, 3A8 o Chi220 y teñidos con un 2C10 conjugado con APC para evaluar la capacidad de cada anticuerpo para el bloqueo cruzado de 2C10.

Descripción detallada

65 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende anticuerpos anti-CD40 humanizados y fragmentos de anticuerpos como se especifica en las reivindicaciones que tienen la capacidad de unirse a un epítipo particular en la molécula CD40, así como a usos de dichos anticuerpos. Esta especificidad

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

5

Producción e identificación de anticuerpos CD40

Se inmunizaron ratones (cepa AJ) con una proteína de fusión que consistía en el dominio extracelular de CD40 de macaco de la India (*M. mulatta*) (secuencia de aminoácidos:

10

EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPCSESEFLDTWNRETRCHQHXYCDPNL

GLRVQQKGTSETDTICTCEEGLHMCSESESCV; SEQ ID NO:5) fusionado con la proteína de unión a maltosa

(CD40-MBP). La secuencia de aminoácidos en esta región de la proteína CD40 de macaco de la India difiere de la proteína CD40 humana en cinco posiciones de aminoácidos (secuencia de aminoácidos humana:

15

EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPCGESEFLDTWNRETHCHQHXYCDPNL

LGLRVQQKGTSETD TICTCEEGLHMCSESESCV; SEQ ID NO:6). Se administró CD40-MBP a ratones múltiples veces con adyuvante de Freund completo y adyuvante de Freund incompleto. Se fusionaron esplenocitos de ratones inmunizados con la línea celular de mieloma de ratón SP2/0 y se seleccionaron híbridos usando tecnología de hibridoma estándar.

20

Los anticuerpos se seleccionaron por su reactividad a una segunda proteína de fusión que consistía en el mismo dominio de CD40 de macaco de la India fusionado con glutamina sintetasa (CD40-GST). Los anticuerpos reactivos a CD40-GST por ELISA se sometieron a prueba además para determinar la reactividad a CD40 natural expresado en linfocitos B de sangre de macaco de la India, linfocitos B de sangre humana y líneas celulares de linfocitos B linfoblastoides de macaco de la India mediante citometría de flujo. Como nivel final de selección, los anticuerpos se sometieron a prueba en un ensayo in vitro para determinar su capacidad para inhibir la activación de linfocitos B humanos o de macaco de la India después de cocultivo con células Jurkat D1.1 que expresaban CD154. Se obtuvo un subclon estable del anticuerpo anti-CD40 2C10 mediante dilución limitante. El anticuerpo es un IgG1-kappa de ratón.

25

30 **Clonación de anticuerpos**

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

35

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

40

Inverso kappa de ratón: 5' - CTA ACA CTC ATT CCT GTT GAA GCT CTTGAC (SEQ ID NO:7);

Directo kappa de ratón: 5' - GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC - 3' (SEQ ID NO:8)

45

Inverso IgG1 de ratón: 5' - GGC AAC GTT GCA GGT CTC GC - 3' (SEQ ID NO:9)

Directo IgG1 de ratón: 5' - CTG GAT CTG CTG CCC AAA CTA ACT CC - 3' (SEQ ID NO:10)

50

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

55

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

60

Las cadenas pesada y ligera recombinantes se subclonaron en vectores de expresión y se empaquetaron en vectores retrovíricos usados para transducir células de ovario de hámster chino usando la tecnología de expresión GPEX™ (Catalent Pharma Solutions, Middleton, WI). Se cultivó un conjunto de células transducidas en medio sin suero y el anticuerpo segregado se purificó mediante cromatografía de afinidad con proteína A. Los anticuerpos anti-IgG1 (2C10R1, 3A8R1) e IgG4 (2C10R4) quiméricos purificados de macaco de la India se diafiltraron en tampón fosfato; se confirmó que los niveles de endotoxina eran inferiores a 1 unidad de endotoxina/mg.

65

Caracterización de anticuerpos

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

5

Para evaluar la capacidad de 2C10 para unirse tanto a CD40 de macaco de la India como humano, se adsorbieron CD40 humano o de macaco de la India expresados de forma recombinante en placas ELISA y se hicieron reaccionar con concentraciones variables de 2C10. La unión de 2C10 a CD40 se detectó usando anticuerpos de cabra anti-IgG-HRP de ratón en un ELISA. Los resultados de la figura 2B muestran que 2C10 tiene afinidades de unión similares al CD40 de macaco de la India y humano, lo cual es importante para la traducción clínica de 2C10. Para confirmar la capacidad de 2C10 para bloquear la unión de su ligando afin, CD 154, se incubaron linfocitos B de macaco de la India y humanos con concentraciones crecientes de 2C10 o un control de isotipo y, a continuación, se incubaron con CD154 soluble marcado con histidina (R&D Systems, Minneapolis, MN) y se analizaron para determinar la expresión de histidina. 2C10 bloqueó la unión de CD154 de una manera dependiente de la dosis (figura 3), lo que indica que 2C10 puede bloquear eficazmente la interacción de CD154 unido a linfocitos T con CD40 en linfocitos B y células presentadoras de antígenos.

10

15

2C10 bloquea la activación de linfocitos B en leucocitos monomorfonucleares en sangre periférica de macaco de la India y humanos

20

El anticuerpo anti-CD40 2C10 se caracterizó con respecto a su capacidad para afectar a la activación de linfocitos B usando leucocitos monomorfonucleares de sangre periférica (PBMC) tanto de macaco de la India como humanos. Se eligió la expresión de CD20 como indicador de linfocitos B, y la expresión de CD23, CD80 y CD86 está asociada con la activación de linfocitos B. Se evaluó por primera vez la capacidad de 2C10 para unirse a CD20. Se incubaron PBMC de macaco de la India o humanos con 2C10 conjugado con fluorocromo y un anticuerpo anti-CD20. Se usó un análisis de citometría de flujo para confirmar la unión de 2C10 a linfocitos B CD20+ humanos y de macaco de la India (figura 2A). En otro conjunto de experimentos, se cultivaron PBMC de macaco de la India o de humanos en presencia o ausencia de células Jurkat D1.1 CD154+, una línea celular de linfocitos T inmortalizados. La activación de linfocitos B se determinó midiendo la expresión de tres marcadores (CD23, CD80 y CD86) en las células CD20+ presentes en los PBMC. El esquema general de este ensayo se muestra en la figura 4. Como se muestra en la figura 4, el cultivo de PBMC en presencia de células Jurkat dio como resultado una expresión incrementada de los tres marcadores, lo que indica que los linfocitos B son activados por las células Jurkat CD154+.

25

30

35

Para someter a prueba la capacidad de los anticuerpos para bloquear la activación de linfocitos B, se cocultivaron PBMC y células Jurkat en presencia o ausencia de uno de tres anticuerpos: 3A8, 5C8 y 2C10. El anticuerpo 3A8 es un anticuerpo de ratón anti-CD40 humano (n.º de depósito ATCC HB-12024) y 5C8 es un anticuerpo anti-CD154 (n.º de depósito ATCC CRL-10915). Cada uno se usó como control positivo. Los cocultivos se realizaron en un intervalo de cinco órdenes de magnitud de concentración de anticuerpos (de 0,001 µg a 10 µg). Como se muestra en la figura 5, 3A8 no bloqueó la activación de linfocitos B en los PBMC de macaco de la India, medida por la expresión de CD23, mientras que tanto 2C10 como 5C8 pudieron bloquear la activación con una eficacia similar. También se observaron cambios correspondientes con la expresión de CD80 y CD86. Estos resultados indican que 2C10 se une a un epítipo diferente en CD40 que en 3A8. Estos resultados también indican que 2C10 actúa principalmente como un antagonista de CD40, en contraste con 3A8, que se ha demostrado previamente que actúa como agonistas parciales con un potencial estimulante débil (Adams et al., J. Immunol. 174:542-50, 2005, Badell et al., aceptado para publicación en Am. J. Transplant., 2011). Cuando se realizó un experimento similar usando PBMC humanos, en lugar de los de macaco de la India, se observó nuevamente que tanto 2C10 como 5C8 bloqueaban la activación de linfocitos B, como se mide mediante la expresión de CD86, con una eficacia similar. Aquí, el anticuerpo 3A8, a diferencia de los PBMC de macaco de la India, bloqueó la activación de linfocitos B (figura 6).

40

45

50

Los anticuerpos 2C10 y 3A8 también se sometieron a prueba para determinar su capacidad para activar linfocitos B en ausencia de células Jurkat usando PBMC de macaco de la India o bien humanos. Aquí, los PBMC se cultivaron en presencia o ausencia de 2C10 o 3A8. A continuación, se midió la expresión de CD23, CD80 y CD86 en células CD20+. Como se muestra en la figura 7, la expresión de CD23 en células de macaco de la India se incrementó en presencia del anticuerpo 3A8, pero no del 2C10. Por el contrario, ni 3A8 ni 2C10 activaron linfocitos B humanos. Las diferencias en la actividad observadas entre el anticuerpo 3A8 y 2C10 indican que el anticuerpo 2C10 se une a un epítipo diferente al del anticuerpo 3A8.

55

60

2C10 evita una producción de anticuerpos dependiente de linfocitos T

Habiendo establecido que 2C10 se une a un epítipo único en CD40, inhibe la activación de linfocitos B de forma similar a un anticuerpo anti-CD154 y carece de propiedades agonistas, a continuación se caracterizaron los efectos de 2C10 in vivo. Se generaron formas químicas recombinantes ratón-macaco de la India de 2C10 usando secuencias de la región constante de la cadena pesada de IgG1 (2C10R1) o IgG4 (2C10R4) de macaco de la India y de la cadena ligera kappa de macaco de la India. También se generó una forma química de IgG1 de macaco de

65

la India de 3A8 (3A8R1) para su uso como control.

Los macacos de la India se inmunizaron una vez el día cero con antígeno de hemocianina de lapa californiana conjugada con 4-hidroxi-3-nitrofenilacetilo (KLH, 10 mg i.m.) (Biosearch Technologies, Novato, CA). Antes de la
 5 inmunización y en la semana uno, cohortes de tres animales recibieron una dosis intravenosa (50 mg/kg) de 2C10R1, 2C10R4, 3A8R1 o solución salina. Se observó a todos los animales durante 70 días y se realizó una citometría de flujo semanalmente. El tratamiento con cualquiera de los isotipos de 2C10 recombinantes dio como resultado un cambio modesto en el recuento de linfocitos B periféricos (figura 8) en comparación con la disminución significativa y prolongada de linfocitos B periféricos previamente informada que se produce en animales que
 10 reciben 3A8R1 (Badell et al., Am. J. Transplant. 10:214, 2010) o bien Chi220 (Adams et al., J. Immunol. 174:542-50, 2005).

La producción de anticuerpos dependientes de linfocitos T a KLH-NP se sometió a prueba mediante ELISA. Se recubrieron placas con KLH (0,01 mg/ml, Sigma, St. Louis, MO) y se bloquearon con Super Block (Thermo Scientific, Woodstock, GA). Se diluyeron sucesivamente muestras de plasma previas y posteriores al tratamiento, se sembraron en placas durante 1 hora y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato/Tween al 0,05 %. Los anticuerpos anti-KLH se detectaron mediante incubación durante 1 h con anti-IgG monoclonal de macaco de la India conjugado con peroxidasa de rábano picante (clon 1B3, NHP Reagent Resource, Boston, MA). A continuación, las placas se incubaron con solución de sustrato de peroxidasa (KPL). Se añadió a continuación
 15 solución de parada (KPL) y se leyó la densidad óptica en un lector de placas de ELISA a 450 nm. Una muestra se consideraba positiva a una dilución dada si la lectura de densidad óptica del plasma posterior al tratamiento superaba la densidad óptica del plasma previa al tratamiento a la misma dilución en un factor de 2. Después de la inmunización con KLH, los animales de control desarrollaron IgG específica de KLH con títulos altos (figura 9). Los animales que recibieron 3A8R1 también desarrollaron producción de anti-KLH, pero los títulos fueron aproximadamente 10 veces menores que en los controles a pesar de la disminución significativa de linfocitos B. Por el contrario, la generación de anticuerpos IgG anti-KLH se bloqueó casi por completo hasta el día 56 en todos los
 20 animales que recibieron 2C10R1 o 2C10R4.

2C10 prolonga significativamente la supervivencia del aloinjerto de islotes en un modelo de macaco de trasplante alogénico de islotes. Se sometió a prueba además 2C10R4, el anticuerpo IgG4 quimérico purificado anti-CD4 de macaco de la India, en un modelo de trasplante alogénico de islotes de primates no humanos (figura 10). Se sometió a pancreatectomía de donante a macacos de la India que pesaban 10-20 kg un día antes del trasplante por medio de una laparotomía mediana. El páncreas se aisló y se colocó en hielo después de que se desangró a los animales al sacrificio. Se realizó el aislamiento de los islotes usando colagenasa/proteasa neutra (950 unidades Wunsch y 63 unidades, respectivamente; Serva, Heidelberg, Alemania). El páncreas digerido se purificó en un gradiente Euroficol discontinuo de cuatro fases (Mediatech, Manassas, VA) y un procesador de células sanguíneas Cobe 2991 (CaridianBCT, Lakewood, CO).
 30

Las muestras de la preparación final de los islotes se contaron y expresaron como equivalentes de islotes (IEQ). Los islotes aislados se cultivaron durante la noche, se contaron y se suspendieron en medio de trasplante (Mediatech).
 40

Se indujo diabetes a macacos de la India que pesaban 3-5 kg usando estreptozotocina (1250 mg/m² i.v.; Zanosar, Teva Parenteral Medicines, Irvine, CA) cuatro semanas antes del trasplante. La diabetes se confirmó mediante prueba de tolerancia a la glucosa intravenosa (IVGTT) con un bolo de solución glucosada de 500 mg/kg y medición del péptido C de primate. Se controlaron los niveles de glucosa y se midió el péptido C al inicio y 10, 30, 60 y 90 después de la inyección de solución glucosada. La diabetes se confirmó mediante la medición de niveles elevados de glucemia en ausencia de péptido C sérico detectable. Los receptores diabéticos se sometieron a un alotrasplante de islotes con incompatibilidad MHC. Se infundió una media de 15 745 (±4063) IEQ por medio de una pequeña laparotomía mediana y canulación de una vena mesentérica.
 45
 50

Los niveles de glucemia se midieron dos veces al día mediante punción auricular; se administraron insulina NPH (Novolin; Novo Nordisk, Princeton, NJ) y glargina (Lantus; Sanofi-Aventis, Bridgewater, NJ) para mantener la glucemia en ayunas (FBG) por debajo de 300 mg/dl antes del trasplante y después del rechazo del injerto. La IVGTT se realizó periódicamente después del trasplante para controlar la función del injerto. Los receptores de trasplante se sometieron a un análisis de citometría de flujo semanal para controlar las poblaciones de linfocitos T (CD3 V450, CD4 PerCP-Cy5.5, CD8 PerCp; BD Bioscience) y linfocitos B (CD20 PE, BD Bioscience). Después del prendimiento del injerto de islotes, el rechazo se definió como FBG mayor de 130 mg/dl en dos días consecutivos. El criterio de valoración principal fue la supervivencia del injerto de islotes sin rechazo. Todos los animales usados en estos experimentos se trataron de conformidad con el IACUC de la Universidad Emory y la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio.
 55
 60

Los receptores de trasplante recibieron 2C10R4, basiliximab (Simulect, Novartis, Basilea, Suiza) y sirólimus, o basiliximab y sirólimus solos. Se administró 2C10R4 (50 mg/kg) por vía intravenosa el día de posoperatorio (DPO) 0 y 7. Se administró basiliximab (0,3 mg/kg) por vía intravenosa los DPO 0 y 3. Se administró sirólimus por vía intramuscular diariamente para alcanzar niveles mínimos de 5-15 ng/ml hasta el DOP 120. Los tres animales que
 65

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

5 El tratamiento con los regímenes descritos anteriormente dio como resultado una supervivencia del injerto de islotes significativamente prolongada (figura 11A) en comparación con los controles que recibieron solo inducción con basiliximab y tratamiento de mantenimiento con sirólimus (figura 11B). La mediana del tiempo de supervivencia del injerto sin rechazo en los animales que recibieron 2C10R4 es de 280 días en comparación con 8 días en los animales de control ($p=0,010$, Tabla 1). Los datos farmacocinéticos predicen que los niveles plasmáticos de 2C10R4 serían inferiores a 1 $\mu\text{g/ml}$ para el DPO 100. Dado que el tratamiento con sirólimus se suspendió el DPO 120, el receptor con la supervivencia más prolongada (304 días) no recibió inmunosupresión durante aproximadamente 24 semanas antes del rechazo. Ningún animal tratado con 2C10R4 desarrolló complicaciones infecciosas clínicamente relevantes o pérdida de peso. Estos resultados reflejan los animales que recibieron el isotipo IgG4 de 2C10. Dos animales adicionales que recibieron el isotipo IgG1 de 2C10 (2C10R1) en combinación con basiliximab y sirólimus lograron una supervivencia del injerto prolongada de forma similar de

220 y 162 días (datos no mostrados). Dados los resultados positivos con 2C10 usado como tratamiento de inducción, la siguiente etapa es evaluar los efectos sobre la supervivencia del injerto mediante la administración de 2C10 como tratamiento de mantenimiento.

20

Tabla 1

Receptor	Tratamiento	IRQ/kg	Supervivencia del injerto (días)	Comentario
DP4A	2C10R4/Basilixiab/Sirólimus	21 973	296	Rechazo
RAo13	2C10R4/Basilixiab/Sirólimus	14 388	304	Rechazo
RZq13	2C10R4/Basilixiab/Sirólimus	15 881	265	Rechazo
RRq13	2C10R4/Basilixiab/Sirólimus	20 596	163	Rechazo
RQz6	Basiliximab/Sirólimus	12 980	8	Rechazo
Rlb7	Basiliximab/Sirólimus	10 903	8	Rechazo
RMc11	Basiliximab/Sirólimus	13 796	10	Rechazo

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

25 El bloqueo de la vía CD40/CD154 puede resultar útil junto con otros agentes bloqueadores de coestimulación. El belatacept, una versión de alta afinidad de CTLA4-Ig diseñada para bloquear las vías coestimuladoras CD28B7, ha demostrado eficacia en modelos de primates no humanos de trasplante renal y de islotes y en ensayos clínicos de fase II y III en trasplante renal (Larsen et al., Transplantation 90:1528-35, 2010, Vincenti et al., Am. J. Transplant. 10:535-46, 2010, Adams et al., J. Immunol. 174:542-50, 2005, Adams et al., Diabetes 51:265-70, 2002, Larsen et al., Am. J. Transplant. 5:443-53, 2005, Vincenti et al., N. Engl. J. Med. 358:770-81, 2005). El ensayo BENEFIT reveló una función renal superior en pacientes tratados con belatacept; sin embargo, estos pacientes tenían una incidencia mayor y un grado más grave de rechazo agudo comprobado por biopsia (Larsen et al., Transplantation 90:1528-35, 2010, Vincenti et al., Am. J. Transplant. 10:535-46, 2010). En vista de esta tasa incrementada de rechazo agudo y de la sinergia entre el bloqueo de CD40 y B7 (Larsen et al., Nature 381:434-8, 1996), a continuación se sometió a prueba la eficacia del tratamiento combinado de 2C10 y belatacept en el trasplante de riñón de primate no humano.

35

Mapeo de epítotos

40 Los expertos en la técnica conocen procedimientos para identificar el epítoto particular al que se une un anticuerpo. Las técnicas estándar incluyen la exploración de péptidos, en la que péptidos cortos superpuestos (por ejemplo, 10-30 aminoácidos, por ejemplo, 20 de longitud) derivados de la proteína de longitud completa a la que se une el anticuerpo se someten a prueba individualmente para determinar su capacidad para unirse al anticuerpo. A partir de dichos experimentos, a continuación se puede determinar la región de la proteína a la que se une el anticuerpo.

45

La mutagénesis dirigida al sitio también se puede usar para identificar la región o regiones antigénicas de una proteína particular. En este enfoque, se introducen sistemáticamente mutaciones puntuales en el polipéptido diana y se usa la capacidad del anticuerpo para unirse al péptido con mutaciones en diversas posiciones para determinar si una región particular de esa proteína contiene el epítoto al que se une el anticuerpo.

50

Los epítotos de anticuerpos también se pueden identificar usando técnicas de mutagénesis de alto rendimiento, tales como mutagénesis indiscriminada (Integral Molecular, Inc., Filadelfia, PA), que se puede usar para generar un gran número de mutaciones dentro de la proteína diana. Dichas metodologías permiten la identificación eficaz de

epítopos dentro de la proteína.

Para determinar si diversos anticuerpos contra CD40 se unen a epítopos similares, se realizó un ensayo de bloqueo competitivo in vitro. Se usaron en el ensayo los anticuerpos 2C10, 3A8 y Chi220, un anticuerpo específico de CD40 de IgG1 quimérico. 2C10 se conjugó con alofocianina (APC) usando el kit de marcado de anticuerpos Lightning Link (Novus Biologics, Littleton, CO). Los PBMC humanos se incubaron con concentraciones crecientes de 2C10, 3A8 o Chi220 y, a continuación, se tiñeron con 2C10 conjugado con APC para evaluar la capacidad de cada anticuerpo para bloquear 2C10 de forma cruzada. La unión de 2C10 conjugado con APC disminuyó con concentraciones crecientes de 2C10 pero no de Chi220 o 3A8, como se muestra en la figura 12. El resultado indica que 2C10 se une a un epítipo único distinto de Chi220 o 3A8.

Generación de anticuerpos adicionales.

Se pueden preparar anticuerpos adicionales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, policlonales, poliespecíficos o monoespecíficos) contra el epítipo de CD40 reconocido por 2C10, por ejemplo, usando cualquiera de los numerosos procedimientos para la preparación de anticuerpos conocidos en la técnica. En un ejemplo, una secuencia codificante de un epítipo reconocido por el anticuerpo 2C10 se expresa como una fusión C terminal con glutatión S-transferasa (GST) (Smith et al., Gene 67:31-40, 1988). La proteína de fusión se purifica en microesferas de glutatión-Sefarosa, se eluye con glutatión, se escinde con trombina (en un sitio de escisión genomanipulado) y se purifica para la inmunización de conejos. Las inmunizaciones primarias se llevan a cabo con el adyuvante completo de Freund y las inmunizaciones posteriores con el adyuvante incompleto de Freund. Los títulos de anticuerpos se controlan mediante análisis de inmunolectrotransferencia e inmunoprecipitación usando el fragmento de proteína escindido con trombina de la proteína de fusión GST. Los sueros inmunizantes se purifican por afinidad usando proteína acoplada a CNBr-Sefarosa. La especificidad del antisuero se puede determinar usando un panel de proteínas GST no relacionadas.

Como inmunógeno alternativo o complementario a las proteínas de fusión GST, se pueden generar péptidos correspondientes a regiones inmunogénicas relativamente únicas de un polipéptido divulgado y acoplarse a hemocianina de lapa californiana (KLH) a través de una lisina C terminal introducida. El antisuero para cada uno de estos péptidos se purifica de forma similar por afinidad en péptidos conjugados a BSA, y la especificidad se somete a prueba mediante análisis ELISA o de inmunolectrotransferencia usando conjugados peptídicos, o mediante inmunolectrotransferencia o inmunoprecipitación usando el polipéptido expresado como una proteína de fusión GST.

De forma alternativa, los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al epítipo de CD40 reconocido por el anticuerpo 2C10 se pueden preparar usando tecnología de hibridoma estándar (véase, por ejemplo, Kohler et al., Nature 256:495-7, 1975; Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6:511-9, 1976; Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6:292-5, 1976; Hammerling et al., Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, NY, 1981). Una vez producidos, los anticuerpos monoclonales también se pueden someter a prueba para el reconocimiento específico mediante análisis de inmunolectrotransferencia o inmunoprecipitación. De forma alternativa, se pueden preparar anticuerpos monoclonales usando el polipéptido divulgado o descrito anteriormente y una colección de presentación en fagos (Vaughan et al., Nat. Biotechnol. 14:309-14, 1996).

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

Para generar anticuerpos policlonales a gran escala y bajo coste, se puede elegir una especie animal apropiada. Los anticuerpos policlonales se pueden aislar de la leche o el calostro de, por ejemplo, vacas inmunizadas. El calostro bovino contiene 28 g de IgG por litro, mientras que la leche bovina contiene 1,5 g de IgG por litro (Ontsouka et al., J. Dairy Sci. 86:2005-11, 2003). Los anticuerpos policlonales también se pueden aislar de la yema de huevos de pollos inmunizados (Sarker et al., J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 32:19-25, 2001).

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

Se pueden identificar anticuerpos útiles en varios ensayos de cribado diferentes. En primer lugar, los anticuerpos se analizan mediante ELISA para determinar si son específicos para el antígeno inmunizante (es decir, el epítipo

CD40 descrito en el presente documento). Usando técnicas estándar, las placas ELISA se recubren con inmunógeno, el anticuerpo se agrega a la placa, se lava y se detecta la presencia del anticuerpo unido usando un segundo anticuerpo específico para la Ig de la especie en la que se generó el anticuerpo.

- 5 Se puede usar un ensayo funcional in vitro para cribar anticuerpos, por ejemplo, un ensayo de neutralización basado en células dendríticas derivadas de monocitos.

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

Anticuerpos humanizados

15 La invención engloba una composición farmacéutica que comprende anticuerpos humanizados como se especifica en las reivindicaciones. En la técnica se conocen diversos procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan residuos "importados", que típicamente se toman de un dominio variable "importado". La humanización se puede
20 realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones et al., Nature 321:522-5, 1986; Riechmann et al., Nature 332:323-7, 1988; Verhoeven et al., Science 239:1534-6, 1988), sustituyendo secuencias de regiones hipervariables por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE. UU. n.º 4.816.567), donde se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia
25 correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son anticuerpos típicamente humanos en los que al menos algunos residuos de la región hipervariable, así como otros residuos de la región variable, se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

30 La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se van a usar en la preparación de anticuerpos humanizados, puede ser importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado procedimiento de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a la colección completa de secuencias conocidas del dominio variable humano. La secuencia humana más cercana a la del roedor se acepta a continuación como región estructural humana para el anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, Sims et al., J. Immunol. 151:2296-308, 1993; Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-17, 1987. Otro
35 procedimiento usa una región estructural particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Se puede usar la misma región estructural para varios anticuerpos humanizados diferentes. Véase, por ejemplo, Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-9, 1992; Presta et al., J. Immunol. 151:2623-32, 1993.

40 Es deseable además que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con un procedimiento, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de las secuencias originales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están comúnmente disponibles y resultan familiares para los
45 expertos en la técnica. Hay disponibles programas informáticos que ilustran y muestran probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite analizar el probable papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, analizar residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos FR se pueden seleccionar y combinar a partir de
50 secuencias del receptor y de importación de modo que se logre la característica deseada del anticuerpo, tal como una afinidad incrementada por el/los antígeno(s) diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directa y más sustancialmente implicados en influir en la unión al antígeno.

Anticuerpos humanos

55 Los anticuerpos humanos de la presente divulgación se pueden construir combinando secuencias de dominio variable de clon Fv seleccionadas de colecciones de presentación en fagos derivadas de humanos con secuencias de dominio constante humano conocidas (Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227:381-8, 1992; Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-97, 1991). De forma alternativa, se pueden preparar anticuerpos monoclonales humanos mediante el
60 procedimiento del hibridoma. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos se han descrito, por ejemplo, por Kozbor, J. Immunol. 133:3001-5, 1994; Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); y Boerner et al., J. Immunol. 147: 86-95, 1991.

65 Es posible ahora producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que, tras la inmunización, puedan producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por

ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión (JH) de la cadena pesada del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de la línea germinal da como resultado una inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz genética de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-5, 1993; Jakobovits et al., Nature 362:255-8, 1993; Bruggemann et al., Year Immunol. 7:33-40, 1993.

El barajado de genes también se puede usar para derivar anticuerpos humanos a partir de anticuerpos no humanos, por ejemplo, de roedor, donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo no humano de partida. De acuerdo con este procedimiento, que también se denomina "impresión de epítomos", la región variable de la cadena pesada o ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido mediante técnicas de presentación en fagos como se describe en el presente documento se reemplaza por un repertorio de genes de dominio V humanos, creando una población de quimeras de scFv o Fab de cadena no humana/cadena humana. La selección con antígeno da como resultado el aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena no humana / cadena humana en el que la cadena humana restaura el sitio de unión a antígeno destruido al eliminar la cadena no humana correspondiente en el clon de presentación en fagos primario, es decir, el epítipo dirige (imprime) la elección del socio de la cadena humana. Cuando se repite el procedimiento para reemplazar la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase la publicación PCT WO 93/06213). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos mediante injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen residuos de FR o CDR de origen no humano.

Fragmentos de anticuerpos

Se divulgan fragmentos de anticuerpos que comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que comprende preferentemente la región de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos monocatenarios; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

La hidrólisis de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y aún puede reticular el antígeno.

Fv es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. En un modo de realización, una especie Fv bicatenaria consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y uno de la cadena ligera en asociación estrecha y no covalente. En una especie Fv monocatenaria (scFv), un dominio variable de la cadena pesada y uno de la cadena ligera se pueden unir covalentemente mediante un conector peptídico flexible de modo que las cadenas ligera y pesada se puedan asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie Fv bicatenaria. Es en esta configuración en la que las tres regiones hipervariables (HVR) de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Conjuntamente, las seis HVR confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo. El fragmento Fab contiene los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el o los residuos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Los fragmentos de anticuerpo Fv monocatenario o scFv comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. En general, el polipéptido scFv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), págs. 269-315. Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L). Usando un conector que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, los dominios se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen con más detalle, por ejemplo, en la patente europea n.º 404.097; la publicación PCT WO 1993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-34, 2003; y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-8, 1993. Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson et al., Nat. Med. 9:129-34, 2003.

Los fragmentos de anticuerpos se pueden generar por medios tradicionales, tales como hidrólisis enzimática, o por técnicas recombinantes. En determinadas circunstancias, el uso de fragmentos de anticuerpos tiene ventajas con respecto al de anticuerpos completos. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite una eliminación rápida y puede dar lugar a un mejorado acceso a los tumores sólidos. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpos, véase Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134, 2003.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban por medio de hidrólisis proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-17, 1992; y Brennan et al., Science 229:81-3, 1985). Sin embargo, estos fragmentos ahora se pueden producir directamente mediante células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y ScFv se pueden expresar en y segregar de *E. coli*, permitiendo por tanto la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las colecciones de fagos de anticuerpos. De forma alternativa, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10:163-7, 1992). En otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ se aíslan directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ con una semivida in vivo incrementada que comprenden residuos del epítipo de unión al receptor de rescate se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos resultarán evidentes para el experto.

Composiciones farmacéuticas

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica, que contiene un anticuerpo, o una porción o porciones de unión a antígeno del mismo, formulada conjuntamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar en politerapia, es decir, combinadas con otros agentes (por ejemplo, inmunosupresores). Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción adecuados y similares que sean fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intratecal, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, los anticuerpos en las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden recubrir con un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Una composición de la presente invención se puede administrar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la técnica, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. La administración puede ser parenteral, intravenosa, intratecal, subcutánea, oral, tópica o local, por ejemplo, mediante inyección directa en el líquido cefalorraquídeo. La administración intravenosa mediante infusión continua es un procedimiento ejemplar para administrar los anticuerpos terapéuticos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. El compuesto terapéutico puede estar en forma de una solución, una suspensión, una emulsión, un dispositivo de infusión, un dispositivo de suministro para implantación, o se puede presentar como un polvo seco que hay que reconstituir con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. La composición puede estar en forma de pastilla, comprimido, cápsula, líquido o comprimido de liberación mantenida para administración oral; o un líquido para administración intravenosa, intratecal, subcutánea o parenteral; o un polímero u otro vehículo de liberación mantenida para administración local.

Los procedimientos bien conocidos en la técnica para preparar formulaciones se encuentran, por ejemplo, en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (20.^a ed., ed. A.R. Gennaro AR., 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). Las formulaciones para administración parenteral pueden contener, por ejemplo, excipientes, agua estéril, solución salina, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal o naftalenos hidrogenados. Se puede usar polímero de lactida, copolímero lactida/glicólido o copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno biocompatibles y biodegradables para controlar la liberación de los compuestos. Se pueden usar formulaciones de nanopartículas (por ejemplo, nanopartículas biodegradables, nanopartículas lipídicas sólidas, liposomas) para controlar la biodistribución de los compuestos. Otros sistemas de administración potencialmente útiles incluyen partículas de copolímero etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, bombas intratecales, sistemas de infusión implantables y liposomas. La concentración del compuesto en la formulación varía dependiendo de una serie de factores, incluyendo la dosificación del fármaco que se va a administrar y la vía de administración.

Para administrar un compuesto mediante determinadas vías de administración, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el compuesto se puede administrar a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina y soluciones tampón acuosas. Los liposomas incluyen emulsiones CGF de agua en aceite en agua, así como liposomas convencionales (Strejan et al., J. Neuroimmunol. 7:27-41, 1984). Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones

acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica y está incluido en la invención excepto cuando cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios a las composiciones.

5

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

10

15

Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de microfiltración de esterilización. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferentes de preparación son secado a vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada estéril del mismo. Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar una única inyección intravenosa rápida, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis se puede reducir o incrementar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Por ejemplo, los anticuerpos en las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar una o dos veces por semana mediante inyección subcutánea o una o dos veces al mes mediante inyección subcutánea.

20

25

30

Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación, como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos a los que se va a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación de las formas de unidad de dosificación de la invención viene dada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se desea lograr, y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de formular dicha compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

35

40

Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" como se usan en el presente documento quieren decir modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal. Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

45

50

Las composiciones de la invención también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede garantizar tanto mediante procedimientos de esterilización como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico y similares. También puede ser deseable incluir en las composiciones agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares. Además, se puede lograr una absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

55

60

Cuando los compuestos se administran como productos farmacéuticos a humanos y animales, se pueden administrar solos o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, de un 0,001 a un 90 % (más preferentemente, de un 0,005 a un 70 %, tal como de un 0,01 a un 30 %) de ingrediente activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

65

Para administración intravenosa o intratecal o inyección directa, la composición debe ser estéril y fluida hasta el punto de que la composición se pueda administrar mediante jeringa. Además de agua, el vehículo puede ser una

solución salina tamponada isotónica, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, es preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio en la composición. Se puede producir una absorción a largo plazo de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos, que se pueden usar en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables mediante procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración en particular, sin que sea tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, afección, salud general y antecedentes médicos del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Un médico o veterinario experto en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario puede empezar con dosis de los compuestos empleados en la composición farmacéutica a niveles menores que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado e incrementar gradualmente la dosificación hasta lograr el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la invención será la cantidad del compuesto que sea la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis eficaz dependerá en general de los factores descritos anteriormente. Si se desea, la dosis diaria eficaz de una composición terapéutica se puede administrar como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente en formas farmacéuticas unitarias. Si bien es posible que un compuesto se administre solo, es preferente administrar el compuesto como una formulación (composición) farmacéutica.

Se pueden administrar las composiciones terapéuticas con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Los expertos en la técnica conocen ejemplos de implantes, sistemas de administración y módulos bien conocidos útiles en la presente invención.

Afecciones y trastornos

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos descritos en el presente documento se pueden usar en cualquier situación en la que se desee inmunosupresión (por ejemplo, rechazo del trasplante o trastornos autoinmunitarios). Estos anticuerpos son en particular útiles para tratar el rechazo del trasplante, por ejemplo, reduciendo la probabilidad de que el huésped rechace un trasplante en particular o incrementando el tiempo antes de que se produzca el rechazo. Los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden usar junto con el trasplante de cualquier órgano o cualquier tejido que sea adecuado para el trasplante. Los órganos ejemplares incluyen corazón, riñón, pulmón, hígado, páncreas, intestino y timo; los tejidos ejemplares incluyen hueso, tendón, córnea, piel, válvula cardíaca, vena y médula ósea.

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos también se pueden usar para tratar trastornos autoinmunitario, trastornos particulares donde están implicados autoanticuerpos en la patogenia de la enfermedad. Las enfermedades autoinmunitarias que están o pueden estar asociadas a la producción de autoanticuerpos incluyen lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome CREST (calcinosis, síndrome de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), opsoclonia, miopatía inflamatoria (por ejemplo, polimiositis, dermatomiositis y miositis por cuerpos de inclusión), esclerodermia sistémica, cirrosis biliar primaria, enfermedad celíaca (por ejemplo, enteropatía sensible al gluten), dermatitis herpetiforme, síndrome de Miller-Fisher, neuropatía axonal motora aguda (NAMA), neuropatía motora multifocal con bloqueo de la conducción, hepatitis autoinmunitaria, síndrome antifosfolípido, granulomatosis de Wegener, poliangeitis microscópica, síndrome de Churg-Strauss, artritis reumatoide, hepatitis autoinmunitaria crónica, escleromiositis, miastenia grave, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, degeneración cerebelosa paraneoplásica, síndrome de la persona rígida, encefalitis límbica, síndrome de Isaacs, corea de Sydenham, trastorno neuropsiquiátrico autoinmunitario pediátrico asociado con Streptococcus (PANDAS), encefalitis, diabetes de tipo 1 y neuromielitis óptica. Otros trastornos autoinmunitarios incluyen anemia perniciosa, enfermedad de Addison, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis psoriásica, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso (por ejemplo, lupus eritematoso discoide, lupus eritematoso inducido por fármacos y lupus eritematoso neonatal), esclerosis múltiple y artritis reactiva.

Los trastornos adicionales que se pueden tratar mediante los usos de la presente invención incluyen polimiositis,

dermatomiositis, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, uveítis autoinmunitaria, adrenalitis, tiroiditis, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, atrofia gástrica, hepatitis crónica, hepatitis lupoide, aterosclerosis, demencia presenil, enfermedades desmielinizantes, lupus eritematoso cutáneo subagudo, hipoparatiroidismo, síndrome de Dressler, trombocitopenia autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica, pénfigo vulgar, pénfigo, alopecia areata, penfigoide, esclerodermia, esclerosis sistémica progresiva, diabetes de inicio en la edad adulta (por ejemplo, diabetes de tipo II), infertilidad masculina y femenina autoinmunitaria, espondilitis anquilosante, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, poliarteritis nudosa, vasculitis necrosante sistémica, artritis reumatoide de aparición juvenil, glomerulonefritis, dermatitis atópica, rinitis atópica, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Chagas, sarcoidosis, fiebre reumática, asma, aborto recurrente, síndrome antifosfolípido, neumopatía del granjero, eritema multiforme, síndrome poscardiotomía, síndrome de Cushing, hepatitis activa crónica autoinmunitaria, neumopatía de los avicultores, enfermedad alérgica, encefalomielitis alérgica, necrólisis epidérmica tóxica, alopecia, síndrome de Alport, alveolitis, alveolitis alérgica, alveolitis fibrosante, enfermedad pulmonar intersticial, eritema nudoso, piodermia gangrenosa, reacción a transfusión, lepra, malaria, leishmaniosis, tripanosomiasis, arteritis de Takayasu, polimialgia reumática, arteritis temporal, esquistosomiasis, arteritis de células gigantes, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, eccema, granulomatosis linfomatoide, enfermedad de Behcet, síndrome de Caplan, enfermedad de Kawasaki, dengue, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, endoftalmítis, eritema elevado persistente y diutino, eritroblastosis fetal, fascitis eosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, filariasis, ciclitis, ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, ciclitis de Fuch, nefropatía por IgA, púrpura de Henoch-Schonlein, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo del trasplante, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, infección por ecovirus, miocardiopatía, enfermedad de Alzheimer, infección por parvovirus, infección por el virus de la rubéola, síndromes posvacunación, infección congénita por el virus de la rubéola, linfoma de Hodgkin y no hodgkiniano, carcinoma de células renales, mieloma múltiple, síndrome de Eaton-Lambert, policondritis recidivante, melanoma maligno, crioglobulinemia, macroglobulinemia de Waldenstrom, infección por el virus de Epstein-Barr, paperas, síndrome de Evan e insuficiencia gonadal autoinmunitaria.

Inmunosupresores

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos descritos en el presente documento se pueden formular o administrar en combinación con un inmunosupresor. Los ejemplos de inmunosupresores incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de calcineurina (por ejemplo, ciclosporina A (Sandimmune®), ciclosporina G tacrólimus (Prograf®, Profopic®)), inhibidores de mTor (por ejemplo, sirólimus (Rapamune®, Neoral®), temsirólimus (Torisel®), zotarólimus y everólimus (Certican®)), fingolimod (Gilenya™), miriocina, alemtuzumab (Campath®, MabCampath®, Campath-1H®), rituximab (Rituxan®, MabThera®), un anticuerpo monoclonal anti-CD4 (por ejemplo, HuMax-CD4), un anticuerpo monoclonal anti-LFA1 (por ejemplo, CD11a), un anticuerpo monoclonal anti-LFA3, un anticuerpo monoclonal anti-CD45 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD45RB), un anticuerpo anti-CD19 (véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE. UU. 2006/0280738), monabatecept (Orencia®), belatacept, indolil-ASC (derivados de 32-indoléter de tacrólimus y ascomicina), azatioprina (Azasan®, Imuran®), inmunoglobulina linfocitaria y globulina antitímocítica [equina] (At-gam®), micofenolato mofetilo (Cellcept®), micofenolato de sodio (myfortic®), daclizumab (Zenapax®), basiliximab (Simulect®), ciclofosfamida (Endoxan®, Cytosan®, Neosar™, Procytox™, Revimmune™), prednisona, prednisolona, leflunomida (Arava®), FK778, FK779, 15-desoxiespergualina (DSG), busulfano (Myleran®, Busulfex®), fludarabina (Fludara®), metotrexato (Rheumatrex®, Trexall®), 6-mercaptopurina (Purinethol®), 15-desoxiespergualina (Gusperimus), LF15-0195, bredinina, brequinar y muromonab-CD3 (Orthoclone®).

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

La ciclosporina A (CsA; n.º CAS 59865-13-3; patente de EE. UU. n.º 3.737.433) y sus análogos se pueden usar como inmunosupresores. Se conocen una serie de otras ciclosporinas y sus derivados y análogos que presentan actividad inmunosupresora. Las ciclosporinas y sus formulaciones se describen, por ejemplo, en el vademécum estadounidense 2004 Physicians' Desk Reference® (2003) Thomson Healthcare, 58.ª ed. y las patentes de EE. UU. n.º 5.766.629; 5.827.822; 4.220.641; 4.639.434; 4.289.851; 4.384.996; 5.047.396; 4.388.307; 4.970.076; 4.990.337; 4.822.618; 4.576.284; 5.120.710; y 4.894.235.

El tacrólimus (FK506) es un macrólido que ejerce efectos muy similares a la CsA, tanto con respecto a su modo de acción molecular como a su eficacia clínica (Liu, Immunol. Today 14:290-5, 1993; Schreiber et al., Immunol. Today, 13:136-42, 1992); sin embargo, estos efectos se presentan con dosis que son de 20 a 100 veces menores que las de CsA (Peters et al., Drugs 46:746-94, 1993). El tacrólimus y sus formulaciones se describen, por ejemplo, en el vademécum estadounidense 2004 Physicians Desk Reference® (2003) Thomson Healthcare, 58.ª ed. y las

patentes de EE. UU. n.º 4.894.366; 4.929.611; y 5.164.495.

El sirólimus (rapamicina) es un macrólido inmunosupresor de lactama que se puede producir, por ejemplo, por *Streptomyces hygroscopicus*. Numerosos derivados de sirólimus y sus análogos y sus formulaciones se conocen y describen, por ejemplo, en el vademécum estadounidense 2004 Physicians' Desk Reference® (2003) Thomson Healthcare, 58.^a ed., patente europea EP 0467606; publicaciones PCT n.º WO 94/02136, WO 94/09010, WO 92/05179, WO 93/11130, WO 94/02385, WO 95/14023 y WO 94/02136, y las patentes de EE. UU. n.º 5.023.262; 5.120.725; 5.120.727; 5.177.203; 5.258.389; 5.118.677; 5.118.678; 5.100.883; 5.151.413; 5.120.842; y 5.256.790.

Fragmentos de CD40

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

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

Proteínas de fusión

También se divulga una proteína de fusión que incluye un fragmento descrito en el presente documento y una secuencia heteróloga. En determinada divulgación, uno de los compañeros de fusión es la proteína Fc (por ejemplo, Fc de ratón o Fc humana). La fusión también puede ser una secuencia útil para la producción de anticuerpos, por ejemplo, una proteína de unión a maltosa o GST. En otra divulgación, la proteína de fusión es una marca de purificación o detección, por ejemplo, proteínas que se pueden detectar directa o indirectamente tales como proteína fluorescente verde, hemaglutinina o fosfatasa alcalina), dominios de unión a ADN (por ejemplo, GAL4 o LexA), dominios de activación génica (por ejemplo, GAL4 o VP16), marcas de purificación o péptidos señal de secreción (por ejemplo, secuencia señal de preprotiripsina). En otra divulgación, el compañero de fusión puede ser una marca, tal como c-myc, polihistidina o FLAG. Cada compañero de fusión puede contener uno o más dominios, por ejemplo, una secuencia señal de preprotiripsina y una marca FLAG.

Producción de fragmentos de CD40 y proteínas de fusión.

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

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

Una vez que se expresa el fragmento de polipéptido de CD40 recombinante o la proteína de fusión, se puede aislar, por ejemplo, usando cromatografía de afinidad. En un ejemplo, un anticuerpo generado contra el fragmento o la proteína de fusión (por ejemplo, el anticuerpo 2C10) se puede unir a una columna y usarse para aislar el fragmento polipeptídico o la proteína de fusión. Se puede realizar la lisis y el fraccionamiento de las células que albergan el fragmento o proteína de fusión antes de la cromatografía de afinidad mediante procedimientos estándar (véase, por ejemplo, Methods in Enzymology, volumen 182, eds., Abelson, Simon y Deutscher, Elsevier, 1990).

Una vez aislado, el fragmento de polipéptido CD40 o la proteína de fusión se puede, si se desea, purificar adicionalmente, por ejemplo, mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento (véase, por ejemplo, Fisher, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, eds., Work y Burdon, Elsevier, 1980; y Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, tercera edición, ed., Cantor, Springer, 1994).

Los fragmentos de polipéptido CD40 o las proteínas de fusión también se pueden producir mediante síntesis

química (por ejemplo, mediante los procedimientos descritos en *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2.^a ed., 1984, The Pierce Chemical Co., Rockford, IL; and *Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide*, ed., Kates and Albericio, Marcel Dekker Inc., 2000).

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humanizado aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a CD40 que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la totalidad de las regiones hipervariables correspondientes a las expuestas en los aminoácidos 20-132 de SEQ ID. NO:2 y una región variable de la cadena ligera que comprende todas las regiones hipervariables correspondientes a las expuestas en los aminoácidos 23-128 de SEQ ID NO:4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo bloquea la activación de linfocitos B por células Jurkat que expresan CD154 *in vitro* en la que el anticuerpo humanizado o el fragmento de unión a antígeno del mismo se humaniza usando el procedimiento de mejor ajuste para regiones hipervariables y regiones estructurales humanas como se describe en Sims et al., J. Immunol. 151: 2296-308, 1993 o Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-17, 1987.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho CD40 es CD40 de macaco de la India o CD40 humano.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o 2, en la que dicho fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo que carece de la porción Fc o tiene una estructura F(ab')₂, Fab, Fv o scFv.
4. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicha composición está formulada:
- para administración parenteral, intravenosa, subcutánea, oral, tópica, intratecal o local;
 - como una solución o dispersión inyectable estéril; o
 - como solución, microemulsión o liposoma.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, en la que dicha composición farmacéutica está formulada para infusión intravenosa continua.
6. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que dicha composición farmacéutica está formulada para administración parenteral, y en la que dicho vehículo farmacéuticamente aceptable comprende agua estéril y/o solución salina.
7. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso en la supresión del sistema inmunitario en un sujeto.
8. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso en el tratamiento o tratamiento profiláctico del rechazo del trasplante o el incremento del periodo de tiempo antes de que se produzca el rechazo del trasplante en un sujeto que lo necesita.
9. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con reivindicación 7 u 8, en la que dicho sujeto ha recibido, o necesita, un trasplante de órgano, en particular en el que el órgano se selecciona del grupo que consiste en corazón, riñón, pulmón, hígado, páncreas, intestino y timo, o una porción de los mismos; o en el que dicho sujeto ha recibido, o necesita, un trasplante de tejido, en particular en el que el tejido es hueso, tendón, córnea, piel, válvula cardíaca, vena o médula ósea.
10. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicha composición farmacéutica está formulada para su administración en un régimen de tratamiento durante al menos un mes después de dicho trasplante de órgano o dicho trasplante de tejido, en particular en la que dicha composición farmacéutica está formulada para su administración en un régimen de tratamiento durante al menos seis meses después de dicho trasplante de órgano o dicho trasplante de tejido.
11. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para uso en un procedimiento de tratamiento o tratamiento profiláctico de la enfermedad de injerto contra huésped en un sujeto que lo necesita.
12. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso en un procedimiento de tratamiento o tratamiento profiláctico de un trastorno autoinmunitario en un sujeto que lo necesita.
13. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en la que dicho trastorno autoinmunitario:
- está asociado con o provocado por la presencia de un autoanticuerpo;
 - se selecciona del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome CREST (calcinosis,

5 síndrome de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), opsoclonía, miopatía inflamatoria (por ejemplo, polimiositis, dermatomiositis y miositis por cuerpos de inclusión), esclerodermia sistémica, cirrosis biliar primaria, enfermedad celíaca (por ejemplo, enteropatía sensible al gluten), dermatitis herpetiforme, síndrome de Miller-Fisher, neuropatía axonal motora aguda (NAMA), neuropatía motora multifocal con bloqueo de la
10 conducción, hepatitis autoinmunitaria, síndrome antifosfolípido, granulomatosis de Wegener, poliangitis microscópica, síndrome de Churg-Strauss, artritis reumatoide, hepatitis autoinmunitaria crónica, escleromiositis, miastenia grave, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, degeneración cerebelosa paraneoplásica, síndrome de la persona rígida, síndrome de Isaacs, corea de Sydenham, trastorno neuropsiquiátrico autoinmunitario pediátrico asociado con Streptococcus (PANDAS),
15 diabetes de tipo 1 y neuromielitis óptica; o

c) se selecciona del grupo que consiste en anemia perniciosa, enfermedad de Addison, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis psoriásica, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso (por ejemplo, lupus eritematoso discoide, lupus eritematoso inducido por fármacos y lupus eritematoso neonatal), esclerosis múltiple y artritis reactiva.
20

14. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-13,

a) en la que dicho sujeto es un mamífero, en particular en la que dicho sujeto es un humano; o
25

b) en la que dicha composición farmacéutica se administra en un régimen de tratamiento con un segundo agente, tal como la administración dentro de los seis meses de dicha composición farmacéutica, en la que dicho segundo agente es un inmunosupresor, en particular en la que dicho segundo agente se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de calcineurina, tacrólimus, un inhibidor de mTor, fingolimod, miriocina, alemtuzumab, rituximab, un anticuerpo monoclonal anti-CD4, un anticuerpo monoclonal anti-LFA1, un anticuerpo monoclonal anti-LFA3, un anticuerpo anti-CD45, un anticuerpo anti-CD19, monabatacept, belatacept, indolil-ASC; azatioprina, inmunoglobulina linfocitaria y globulina antitímocítica equina, micofenolato mofetilo, micofenolato de sodio, daclizumab, basiliximab, ciclofosfamida, prednisona, prednisolona, leflunomida, FK778, FK779, busulfano, fludarabina, metotrexato, 6-mercaptopurina, 15-desoxispergualina, LF15- 0195, bredinina, brequinar y muromonab-CD3, en la que opcionalmente,
30

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

35 ii) dicho inhibidor de mTor es sirólimus, temsirólimus, zotarólimus o everólimus;

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

iv) dicho segundo agente es belatacept.

40 15. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en la que dicho régimen de tratamiento comprende la administración de dicha composición farmacéutica dentro de una semana o un mes del segundo agente.

Descripción: Clon 2C10 anti-CD40 de ratón

Cadena pesada (péptido señal + región V)

ATGGAAAGGCACTGGATCTTTCTCTTCTGTTGTCAGTAACTGCAGGTGTCCAC
TCCCAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAACCTGGGGCCT
CAGTGAAGATGTCCTGTAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAACTACTGGATGC
ACTGGGTA AACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAAT
CCTAGCAATGATTATACTAAGTACAATCAAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTG
ACTGCAGACAAATCCTCCAACACAGCCTACATGCAACTGGGTAGCCTGACATCT
GAGGACTCTGCAGTCTATTATTGTGCAAGACAGGGGTTTCCTTACTGGGGCCA
AGGGACTCTGGTCACTGTCTCT

Proteína

MERHWIFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYFTNYW
MHWVKQRPGQGLEWIGYINPSNDYTKYNQKFKDKATLTADKSSNTAYMQLGSL
TSEDSAVYYCARQGFYWGQGLVTVS

Cadena pesada (péptido señal + región V)

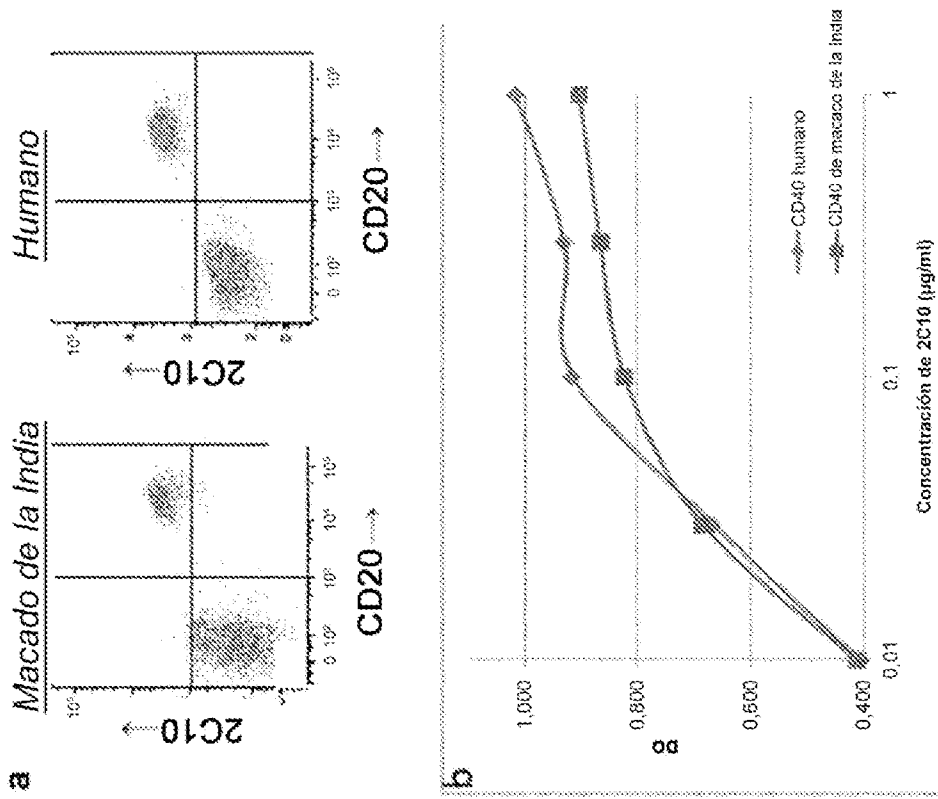
ADN

ATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAA
TATCCAGAGGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCC
AGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGC
ACTGGTACCACCAGAGGTCAGGCACCTCCCCCAAAGATGGATTTATGACACA
TCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGAC
CTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTAC
TGCCACCAGTTGAGTAGTGACCCATTCACGTTCCGGCTCGGGGACAAAGTTGGA
AATAAAA

Proteína

MDFQVQIFSFLLISASVIISRGQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHW
YHQRSGETSPKRWIYDTSKLAGVPARFSGSGSGLYSLTSSMEAEADAATYYCHQL
SSDPFTFGSGTKLEIK

Figura 1



Figuras 2A-2B:

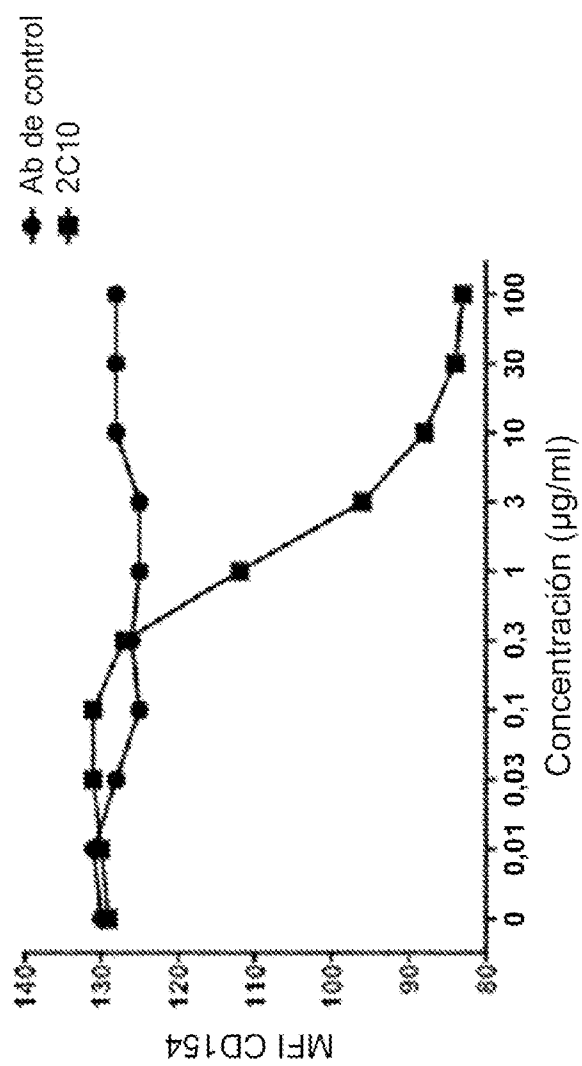
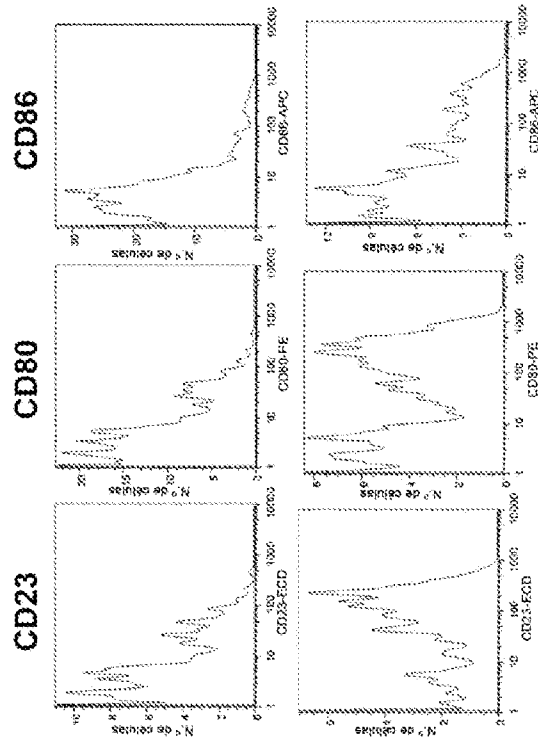
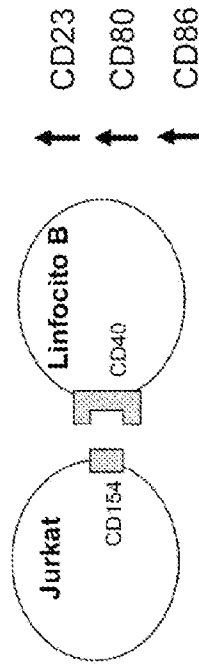


Figura 3

Principio del ensayo:

- Cocultivo de PBMC de macaco de la India o humanos con células Jurkat D1.1 CD154+
- CD154 activa los linfocitos B en PBMC por medio de CD40
- La lectura es el cambio en la expresión de CD23, CD80 y CD86 en linfocitos B



PBMC solos

PBMC cocultivados con células Jurkat D1.1 CD154+

SELECCIONADO EN LINFOCITOS B CD20+

Figura 4

PBMC de macaco de la India
Expresión de CD23 en linfocitos B después de la activación por medio de CD154 (cocultivo con Jurkat)
Bloqueo de la expresión de CD23 inducida por CD154 mediante cocultivo en presencia del anticuerpo indicado

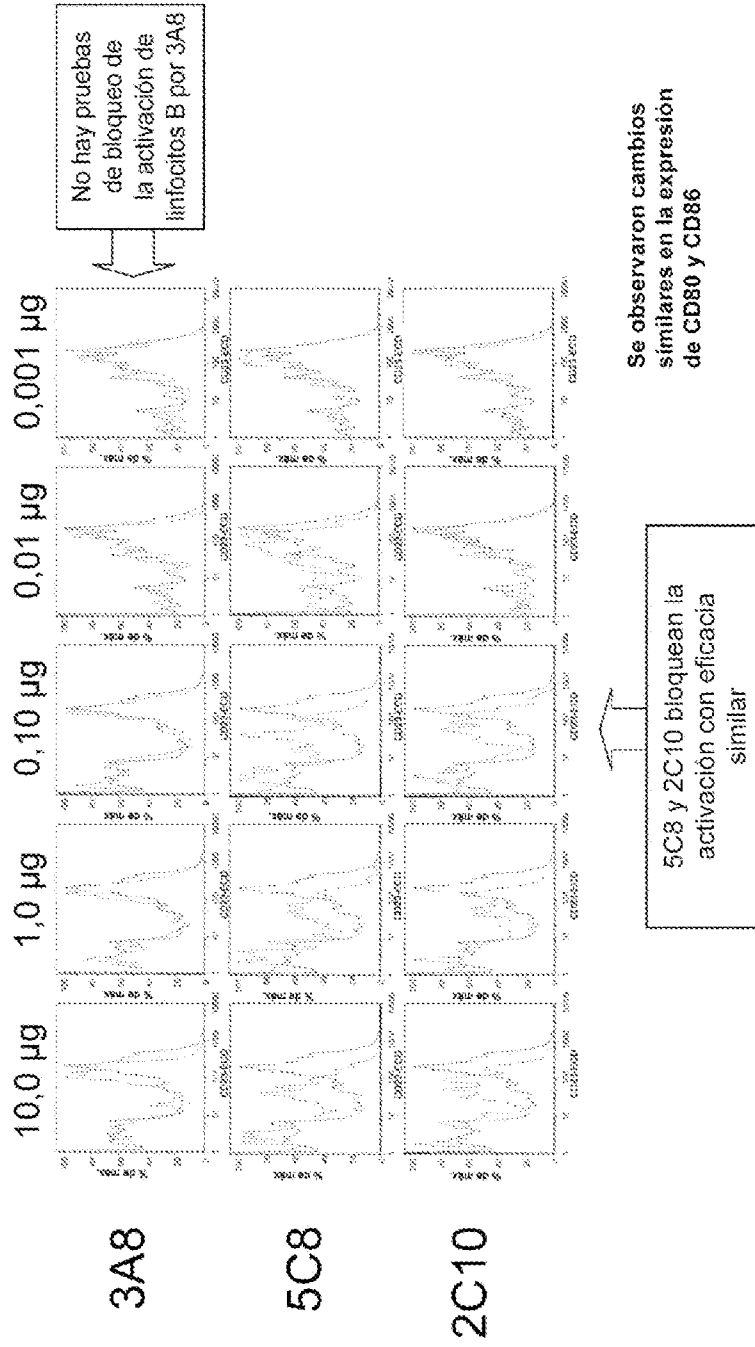


Figura 5

PBMC humanos
Expresión de CD86 en linfocitos B después de la activación por medio de CD154 (cocultivo con Jurkat)
Bloqueo de la expresión de CD86 inducida por CD154 mediante cocultivo en presencia del anticuerpo indicado

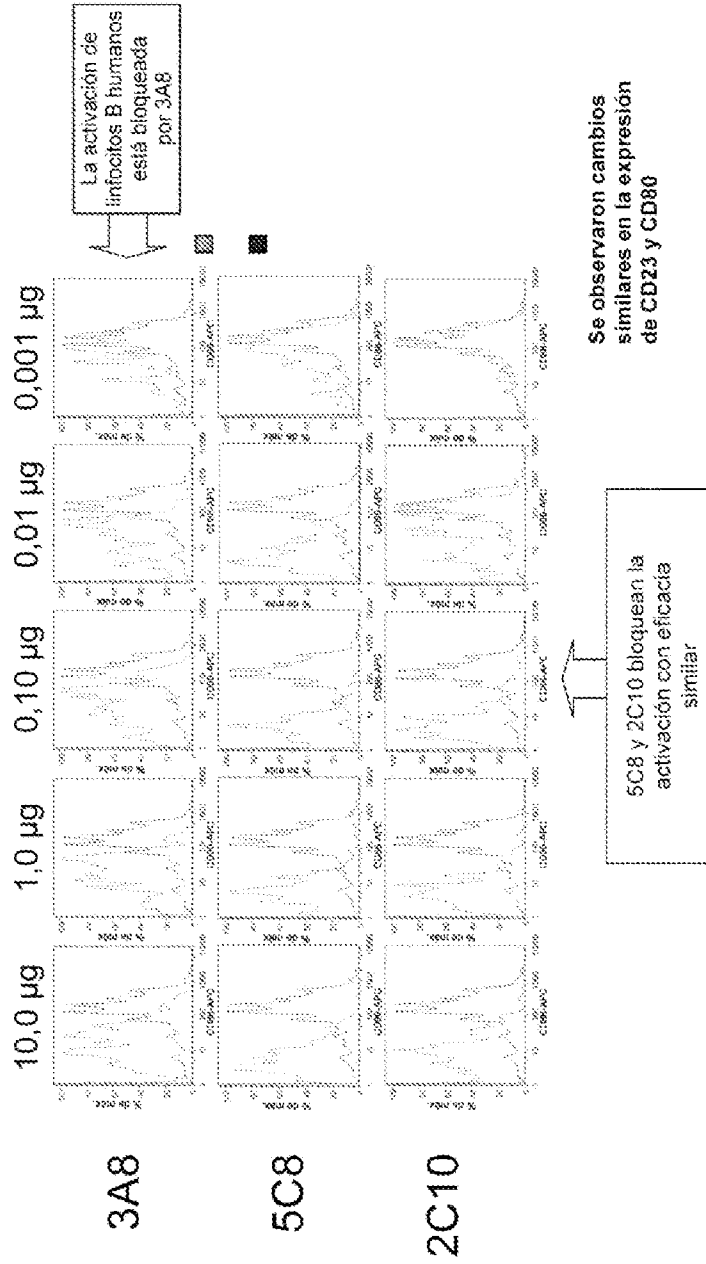


Figura 6

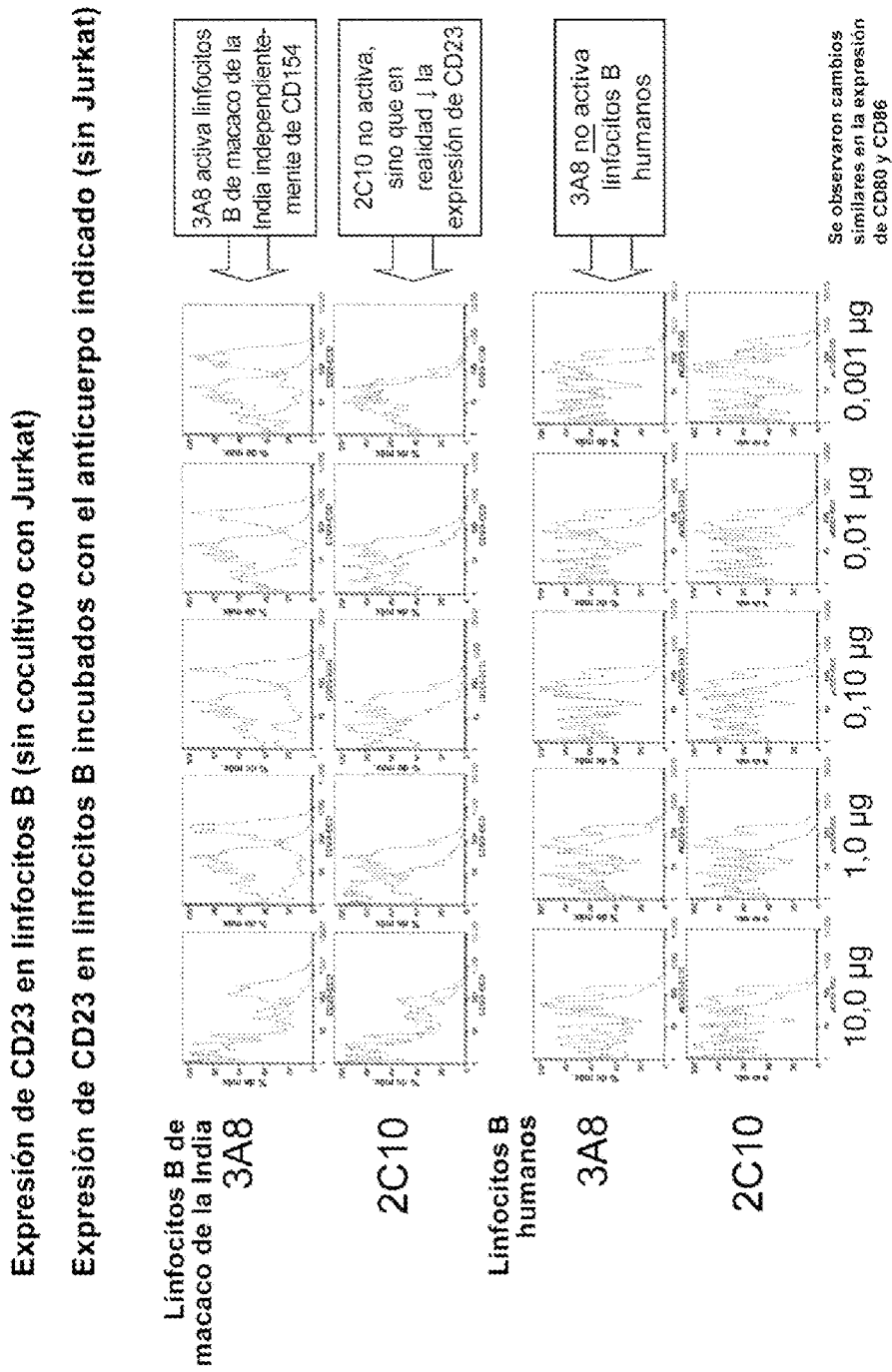


Figura 7

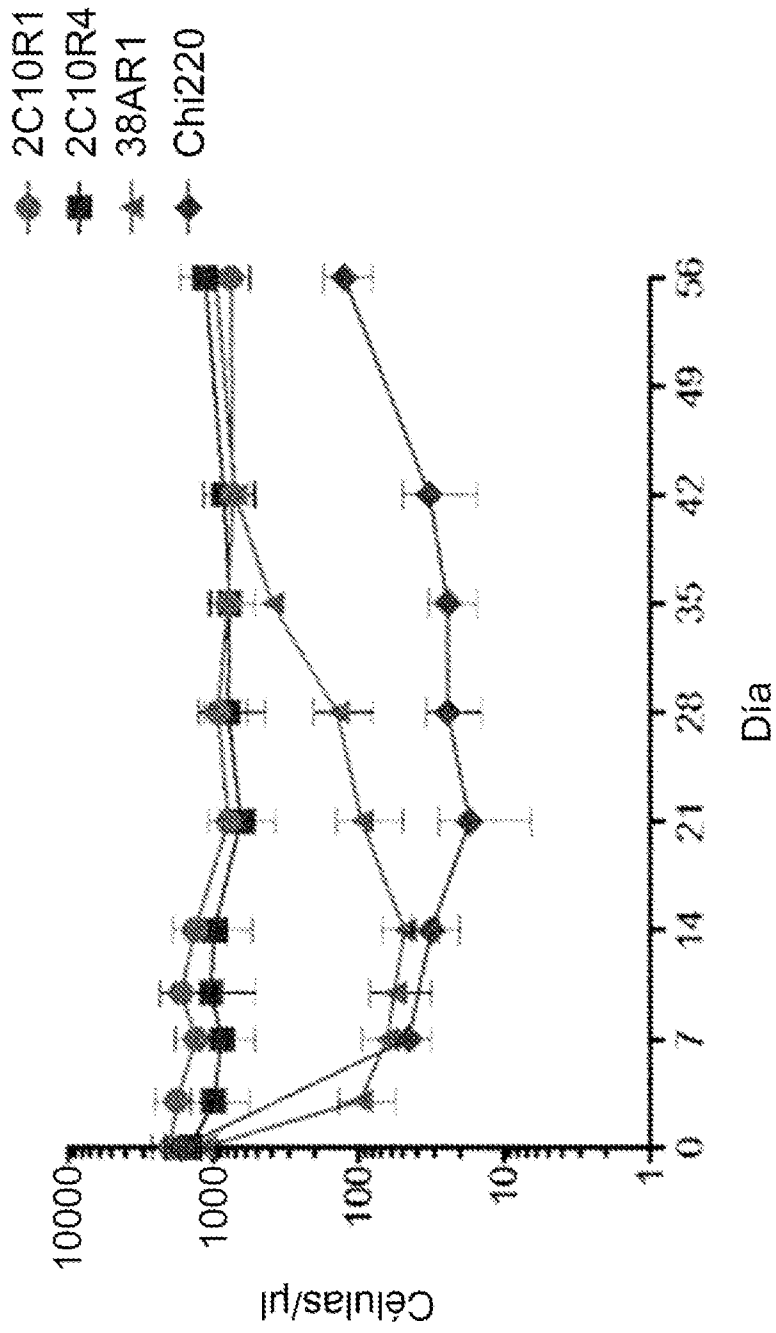


Figura 8

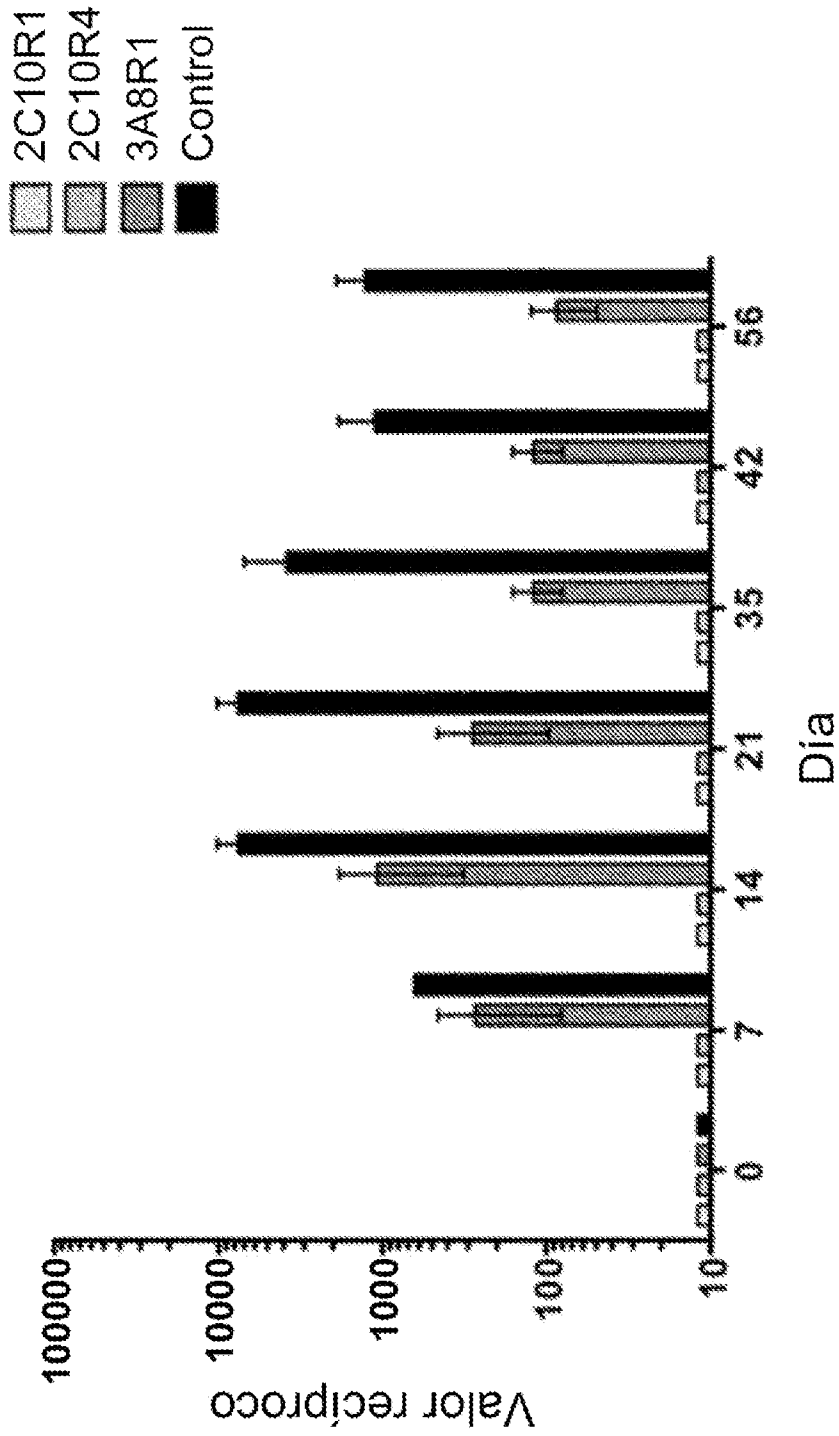


Figura 9

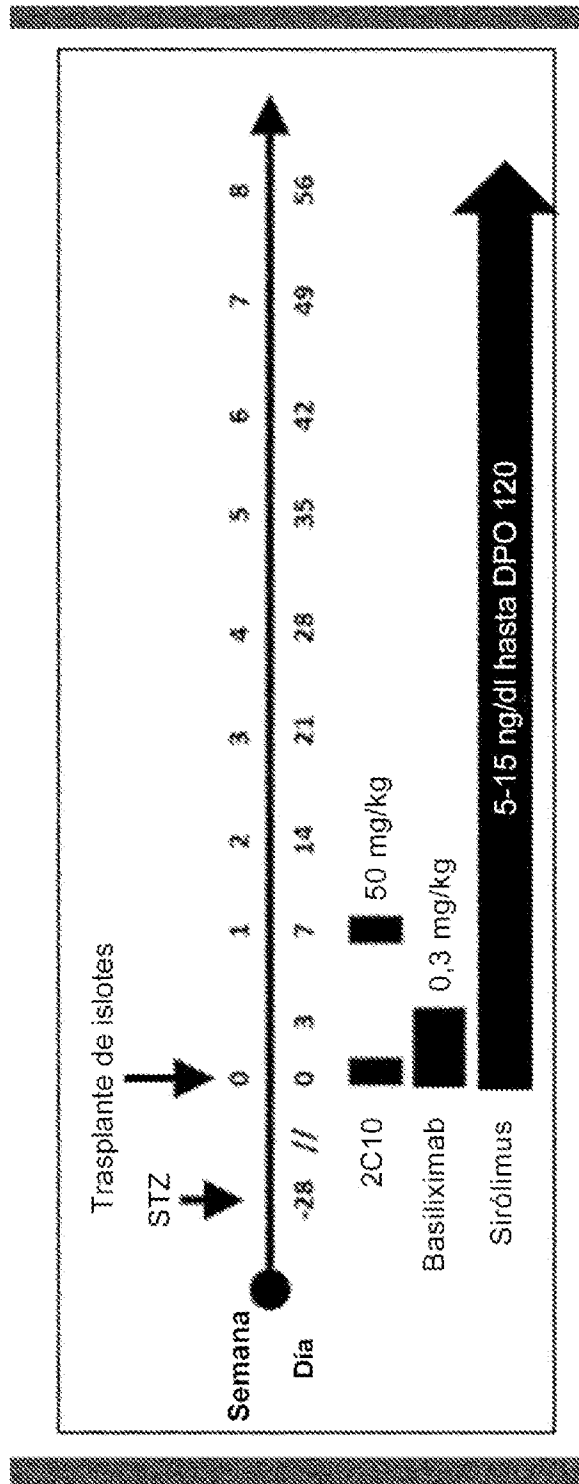
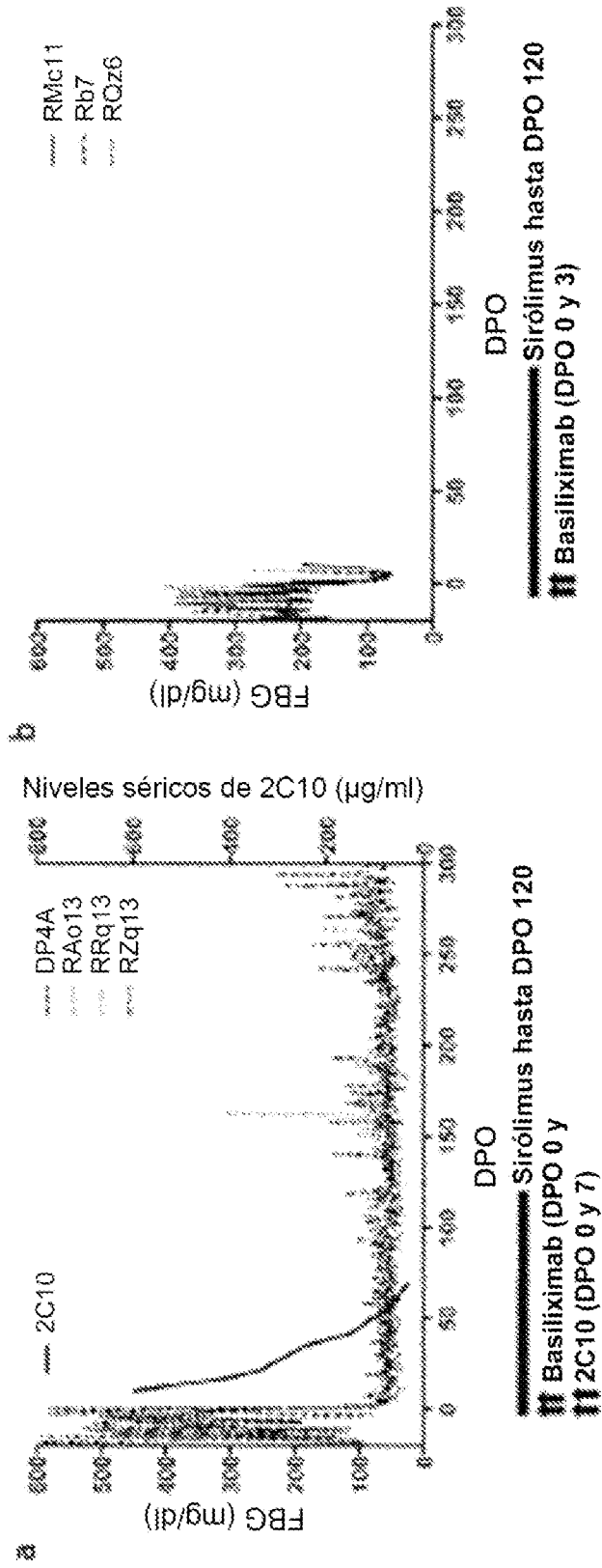


Figura 10



Figuras 11A-11B:

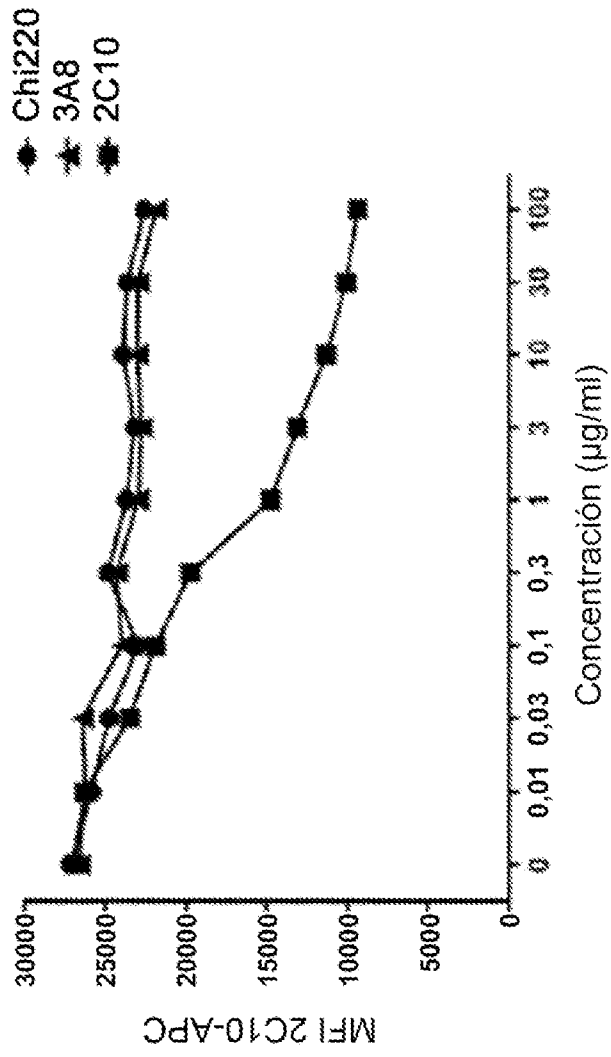


Figura 12