



01 20763

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
2000-3

SOLICITUD DE:

☒ **Patente de Invención** ☐ **Patente de Modelo de Utilidad**

2 SOLICITANTE (74)	Nombre: NOVARTIS AG Dirección: Schwabwalden 32 45 Teléfono: 31 227 532 Fax: 31 227 532 E-mail: novartis@novartis.ch Domicilio: 4058 Basel, Suiza	IDENTIFICACION CC: ☐ NIT: ☐ CE: ☐ Otro: ☐ Número:
--	--	---

3 REPRESENTANTE O APODERADO (74)	Nombre: JIMENA ESCOBAR URIBE Dirección: Cra 11A No 94-76 (Of 305) Teléfono: 6 162051/61 Fax: 6 161889 E-mail: escobaru@elsito.net.co	IDENTIFICACION CC: ☒ NIT: ☐ CE: ☐ Otro: ☐ Número: 39 779 452 T P 68228
--	--	--

INVENTOR(ES) (72)	Nombre: VERANEXOS (S.A.) Dirección: Teléfono: Fax: E-mail: Domicilio:	IDENTIFICACION CC: ☐ NIT: ☐ CE: ☐ Otro: ☐ Número:
-----------------------------	--	---

5 TÍTULO (S) **MOLECULA DE ENLACE DE G515 A CONSTRUCCION DE UN VECTOR DE EXPRESION COMPOSICION Y COMBINACION FARMACUTICAS**

6 Clasificación Internacional (51) **A61K 48/00, C12 N 15/13**

7 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>Gran Bretaña</u>	(32) Fecha <u>Marzo 16, 2000</u>	(31) Numero de Solicitud <u>0006398.2</u>
--	--	---	--

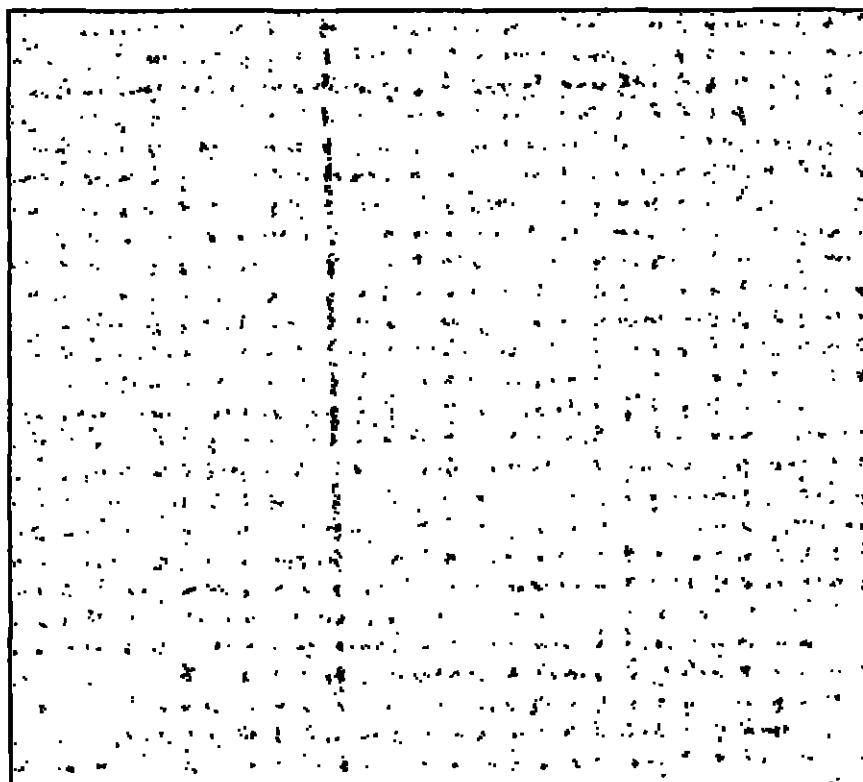
8 Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los:

6 meses ☒ 12 meses ☐ 18 meses ☐ otros ☐

9 Comprobante de pago No. **01 - 61635 y 01 - 61651** **Fecha** **06/07/01 y 14/07/01**

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación
- ☒ Comprobante de pago por la reivindicación de prioridad
- ☒ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica No. 17.398
- ☒ Poderes, si fuere el caso Protocolo No. 17.398
- ☐ Copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☒ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☒ Descripción de la invención
- ☒ Una o más reivindicaciones
- ☒ Dibujos y/o planos necesarios
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .

11 FIGURA CARACTERISTICA



12

NOMBRE: JIMENA ESCOBAR URIBE

FIRMA: *Jimena Escobar Uribe*

C.C. 39.779.452 de Usaquén T.P. 68.288

2440/P

ANEXOS

INVENTORES

- 1.) FRANCO E. DI PADOVA (Birsfelden, Suiza);**
- 2.) WALTER SCHULER (Grenzach-Wyhlen, Alemania);**

Solicito expresamente a nombre de la sociedad **NOVARTIS AG.**, sociedad constituida de conformidad con las leyes de Suiza, domiciliada en 4058 Basilea, Suiza, el otorgamiento de Patente para la invención titulada "**MOLÉCULA DE ENLACE DE CD154, CONSTRUCCIÓN DE ADN, VECTOR DE EXPRESIÓN, COMPOSICIÓN Y COMBINACIÓN FARMACÉUTICAS**".

Clase: A 61.


JIMENA ESCOBAR URIBE
C.C. 39.779.452 de Usaquén
T.P. 68.228
Cod. 5376

4

ADMINISTRACIÓN Y COMERCIO

Folios: 62

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 350 5220
e-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

2440



5

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176009-2

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO

Radicación : 01020763 00223809

Folios: 60

Fecha (UTC): 2001-02-14 15:59:03

Trámite : 602 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2029 DIVISION DE NUESTROS CRECIENTES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 8,857
FECHA : FEBRERO 14 DE 2001

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
ESCOBAR URIBE ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	3032527	13/02/2001	7,823,280.

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50003-01-01 SOLICITUDES	82 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NU	100,000.00
	TOTAL :	100,000.00

SON: CIENTO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 350 5220
e-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

ANTICUERPOS HUMANOS PARA CD154

Esta invención se refiere a anticuerpos para CD154 humano (siendo el CD154 también conocido como gp39 ó CD40-L), y al uso de estos anticuerpos para inhibir una respuesta inmune mediada por interacciones celulares positivas para CD154 con células positivas para CD40, por ejemplo en el tratamiento y/o prevención de enfermedades o desórdenes en donde la interferencia de CD154 con, la modulación, y/o la inhibición de las interacciones de CD154:CD40, sean terapéuticamente benéficas, por ejemplo la prevención de rechazo de injerto de células, tejidos, u órganos, la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunes o inflamatorias, aterosclerosis, o enfermedad de Alzheimer.

Las moléculas de superficie celular que median las funciones auxiliares-efectoras dependientes del contacto de las células T, son importantes para inducir respuestas inmunes que requieran ayuda de células T: Por ejemplo, las interacciones de CD154 sobre las células T con el CD40 sobre las células B, tienen un papel central en la activación de las respuestas de las células B a los antígenos. También se ha demostrado que la inhibición de la interacción entre el CD154 y su receptor CD40, impide la activación de las células T, y puede inducir una tolerancia de células T específica del antígeno. Sin embargo, las interacciones de CD154/CD140 no se restringen a células T y

B o a células presentadoras de antígeno (APCs).

Se han propuesto anticuerpos para CD154 como agentes que bloquean las interacciones de CD154/CD40: se conocen dos anticuerpos monoclonales anti-CD154 humano, humanizados (MAbs) derivados a partir de los MAbs 5c8 y 24-31 anti-CD154 humano de ratón. Sin embargo, todavía existe una necesidad de un método efectivo para modular o bloquear la interacción de CD154/CD40, por ejemplo, con el fin de prevenir o tratar los desórdenes y enfermedades indicados en la presente, por ejemplo para inducir una tolerancia específica en el alotransplante, por ejemplo idealmente mediante el bloqueo de las señales co-estimulantes, mientras que al mismo tiempo se permita el reconocimiento del antígeno y la señalización del receptor de células T.

Ahora hemos preparado anticuerpos mejorados para CD154, para utilizarse en la prevención o el tratamiento de desórdenes, enfermedades, o condiciones como se describen posteriormente en la presente.

De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona una molécula de enlace de CD154, la cual comprende un sitio de enlace de antígeno que comprende cuando menos un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1 CDR2, y CDR3, teniendo la CDR1 la secuencia de aminoácidos Asn-Phe-Ala-Phe-Asn, teniendo la CDR2 la secuencia de aminoácidos Arg-Ile-Leu-Pro-Ser-Leu-Asp-Ile-Ala-Ser, y teniendo la CDR3 la secuencia de aminoá-

cidos Glu-Val-Asp-Gly-Gly-Phe; y sus equivalentes directos.

En un primer aspecto, la invención proporciona una molécula de enlace de CD154 de un solo dominio que comprende una cadena pesada de inmunoglobulina aislada, la cual comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H) como se define anteriormente.

En un segundo aspecto, la invención también proporciona una molécula de enlace de CD154 que comprende ambos dominios variables de cadena pesada (V_H) y de cadena ligera (V_L), en donde esta molécula de enlace de CD154 comprende cuando menos un sitio de enlace de antígeno que comprende:

a) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1, CDR2, y CDR3, teniendo la CDR1 la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ.ID No:5, teniendo la CDR2 la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID No:6, y teniendo la CDR3 la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID No.7, y

b) un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L), el cual comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1', CDR2', y CDR3', teniendo las CDR1' la secuencia de aminoácidos Arg-Ala-Ser-Gln-Gly-Ile-Ser-Ser-Trp-Leu-Ala, como se muestra en la SEQ ID No:8, teniendo la CDR2 la secuencia de aminoácidos Ala-Ala-Ser-Ser-Leu-Gln-Ser, como se muestra en la SEQ ID No:9, y teniendo la CDR3' la secuencia de aminoácidos Gln-Gln-Tyr-Asn-Ser-Tyr-Pro-Phe-Tyr, como se muestra en

las SEQ ID No:5;

y sus equivalentes directos.

A menos que se indique de otra manera, cualquier cadena de polipéptido se describe en la presente teniendo una secuencia de aminoácidos que empieza en la extremidad N-terminal y que termina en la extremidad C-terminal. Cuando el sitio de enlace de antígeno comprende ambos dominios V_H y V_L , éstos se pueden localizar sobre la misma molécula de polipéptido, o de preferencia, cada dominio puede estar sobre una cadena diferente, siendo el dominio V_H parte de una cadena pesada de inmunoglobulina o fragmento de la misma, y siendo V_L parte de una cadena ligera de inmunoglobulina o fragmento de la misma.

"Molécula de enlace de CD154" significa cualquier molécula capaz de enlazarse con el antígeno CD154, ya sea solo o asociado con otras moléculas. La reacción de enlace puede mostrarse mediante métodos convencionales, incluyendo, por ejemplo, un bioensayo para determinar la inhibición del enlace de CD154 con su receptor, o cualquier clase de ensayos de enlace, con referencia a una prueba de control negativo, en donde se utilice un anticuerpo de una especificidad no relacionada, por ejemplo un anticuerpo anti-CD154. De una manera conveniente, el enlace de las moléculas de enlace CD154 de la invención con CD154, se puede demostrar en un ensayo de enlace competitivo.

Los ejemplos de las moléculas de enlace de antígeno incluyen anticuerpos, como los producidos por las células B, o hi-

bridomas, y anticuerpos quiméricos, injertados con CDR o humanos, o cualquier fragmento de los mismos, por ejemplo fragmentos $F(ab')$, y Fab, así como anticuerpos de una sola cadena o de un solo dominio.

- 5 Un anticuerpo de una sola cadena consiste en los dominios variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo covalentemente enlazados por un enlazador peptídico, que normalmente consiste en 10 a 30 aminoácidos, de preferencia en 15 a 25 aminoácidos. Por consiguiente, esta estructura no incluye la parte
- 10 te constante de las cadenas pesada y ligera, y se cree que el pequeño separador de péptido debe ser menos antigénico que toda la parte constante. "Anticuerpo quimérico" significa un anticuerpo en donde las regiones constantes de las cadenas pesada o ligera, o ambas, son de origen humano, mientras que los dominios variables de ambas cadenas pesada y ligera son de origen
- 15 no humano (por ejemplo, de murino), o a partir de un anticuerpo humano diferente. "Anticuerpo injertado con CDR" significa un anticuerpo en donde las regiones hipervariables (CDRs) se derivan a partir de un anticuerpo donador, tal como un anticuerpo no humano (por ejemplo, de murino), o un anticuerpo humano di-
- 20 ferente, mientras que todas o sustancialmente todas las demás partes de la inmunoglobulina, por ejemplo las regiones constantes y las partes más conservadas de los dominios variables, es decir, las regiones de estructura, se derivan a partir de un
- 25 anticuerpo aceptado, por ejemplo un anticuerpo de origen humano.

Sin embargo, un anticuerpo injertado con CDR puede retener unos cuantos aminoácidos de la secuencia donadora en las partes de las regiones de estructura adyacentes a las regiones hipervariables. "Anticuerpo humano" significa un anticuerpo en donde las regiones constantes y variables de ambas cadenas pesada y ligera son todas de origen humano, o sustancialmente idénticas a las secuencias de origen humano, no necesariamente a partir del mismo anticuerpo, e incluye los anticuerpos producidos por ratones, en donde los genes de la parte variable y constante de inmunoglobulina de murino han sido reemplazados por sus contrapartes humanas, por ejemplo como se describe en términos generales en las Patentes Números EP 0546073 B1, USP 5545806, USP 5569825, USP 5625126, USP 5633425, USP 5661016, USP 5770429, EP 0 438474 B1 y EP 0 463151 B1.

Las moléculas de enlace de CD154 particularmente preferidas de la invención son anticuerpos humanos, especialmente el anticuerpo ABI793, como se describe posteriormente en la presente en los ejemplos.

Por consiguiente en los anticuerpos preferidos, los dominios variables de ambas cadenas pesada y ligera son de origen humano, por ejemplo aquéllos del anticuerpo ABI793, que se muestran en la SEQ ID No:1 y en la SEQ ID No:3. Los dominios de la región constante de preferencia también comprenden dominios de la región constante humana adecuados, por ejemplo como se describe en "Sequences of proteins of immunological inte-

rest", Kabat E.A. y colaboradores, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Servicio de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud.

Las regiones hipervariables se pueden asociar con cualquier
5 clase de regiones de estructura, aunque de preferencia son de origen humano. Las regiones de estructura adecuadas se describen en Kabat E.A. y colaboradores, *ibid.* La estructura de cadena pesada preferida es una estructura de cadena pesada humana, por ejemplo aquélla del anticuerpo ABI793 que se muestra en
10 la SEQ ID No:1. Consiste en la secuencia de las regiones FR1, FR2, FR3, y FR4. De una manera similar, la SEQ ID No:3 muestra la estructura de cadena ligera de ABI793 preferida, la cual consiste, en secuencia, en las regiones FR1', FR2', FR3', y FR4'.

15 De acuerdo con lo anterior, la invención también proporciona una molécula de enlace de CD154 que comprende cuando menos un sitio de enlace de antígeno que comprende un primer dominio que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la mostrada en las SEQ ID No:2, empezando con el
20 aminoácido en la posición 1, y terminando con el aminoácido en la posición 118, o un primer dominio como se describe anteriormente, y un segundo dominio que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la mostrada en las SEQ ID No:4, empezando con el aminoácido en la posición 1, y terminan-
25 do con el aminoácido en la posición 107.

Los anticuerpos monoclonales reproducidos contra una proteína que se encuentra naturalmente en todos los seres humanos, normalmente se desarrollan en un sistema no humano, por ejemplo en ratones. Como una consecuencia directa de esto, un anticuerpo xenogénico, como es producido por un hibridoma, cuando se administra a seres humanos, provoca una respuesta inmune indeseable que es mediada predominantemente por la parte constante de la inmunoglobulina xenogénica. Esto limita claramente el uso de estos anticuerpos, debido a que no se pueden administrar durante un período de tiempo prolongado. Por consiguiente, se prefiere particularmente utilizar anticuerpos de una sola cadena, de un solo dominio, quiméricos, injertados con CDR, o especialmente humanos, los cuales no tienen posibilidades de provocar una respuesta alogénica sustancial cuando se administran a seres humanos.

En vista de lo anterior, una molécula de enlace de CD154 más preferida de la invención se selecciona a partir de un anticuerpo anti-CD154 humano, que comprende cuando menos:

- a) una cadena pesada de inmunoglobulina o fragmento de la misma, la cual comprende: (i) un dominio variable que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3, y (ii) la parte constante o fragmento de la misma de una cadena pesada humana; teniendo las CDR1, CDR2, CDR3 la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID Nos:5, 6, y 7, respectivamente, y

b) una cadena ligera de inmunoglobulina o fragmento de la misma, la cual comprende: (i) un dominio variable que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1', CDR2', y CDR3', y (ii) la parte constante o fragmento de la misma de una cadena ligera humana, teniendo las CDR1', CDR2', y CDR3', la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID Nos:8, 9, y 10, respectivamente;

y sus equivalentes directos.

De una manera alternativa, una molécula de enlace de CD154 de la invención se puede seleccionar a partir de una molécula de enlace de una sola cadena, la cual comprende un sitio de enlace de antígeno que comprende:

a) un primer dominio que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1, CDR2, y CDR3, teniendo estas regiones hipervariables las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID Nos:5, 6, y 7, respectivamente;

b) un segundo dominio que comprende las regiones hipervariables CDR1', CDR2', y CDR3', teniendo estas regiones hipervariables las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID Nos:8, 9, y 10, respectivamente; y

c) un enlazador peptídico que se enlaza ya sea a la extremidad N-terminal del primer dominio y a la extremidad C-terminal del segundo dominio, o bien a la extremidad C-terminal del primer dominio y a la extremidad N-terminal del segundo dominio;

y sus equivalentes directos.

Como es bien conocido, los cambios menores en una secuencia de aminoácidos, tales como supresión, adición, o sustitución de uno o varios aminoácidos, pueden conducir a una forma alélica de la proteína original, que tenga propiedades sustancialmente idénticas.

Por consiguiente, el término "sus equivalentes directos", significa cualquier molécula de enlace de CD154 de uno solo dominio (molécula X):

10 (i) en donde las regiones hipervariables CDR1, CDR2, y CDR3, tomadas como un todo, sean cuando menos 80 por ciento homólogas, de preferencia cuando menos 90 por ciento homólogas, más preferiblemente cuando menos 95 por ciento homólogas a las regiones hipervariables mostradas en las SEQ ID Nos:5, 6, y 7, respectivamente, y

(ii) que sea capaz de inhibir el enlace de CD154 con su receptor sustancialmente hasta el mismo grado que una molécula de referencia que tenga las regiones de estructura idénticas a aquéllas de la molécula X, pero que tenga las regiones hipervariables CDR1, CDR2, y CDR3 idénticas a aquéllas mostradas en las SEQ ID Nos:5, 6, y 7, respectivamente;

o cualquier molécula de enlace de CD154 que tenga cuando menos dos dominios por sitio de enlace (molécula X'):

(i) en donde las regiones hipervariables CDR1, CDR2, CDR3, CDR1', CDR2' y CDR3', tomadas como un todo, sean cuando

menos 80 por ciento homólogas, de preferencia cuando menos 90 por ciento homólogas, más preferiblemente cuando menos 95 por ciento homólogas a las regiones hipervariables mostradas en las SEQ ID Nos: 5, 6, 7, 8, 9, y 10, respectivamente, y

- 5 (ii) que sea capaz de inhibir el enlace de CD154 con su receptor sustancialmente hasta el mismo grado que una molécula de referencia que tenga las regiones de estructura y las partes constantes idénticas a la molécula X', pero que tenga las regiones hipervariables CDR1, CDR2, CDR3, CDR1', CDR2', y CDR3'
- 10 idénticas a las mostradas en las SEQ ID Nos: 5, 6, 7, 8, 9, y 10, respectivamente.

En la presente descripción, las secuencias de aminoácidos son cuando menos 80 por ciento homólogas unas a otras si tienen cuando menos el 80 por ciento de residuos de aminoácidos idénticos en igual posición cuando las secuencias quedan óptimamente alineadas, contándose los huecos o las inserciones en las secuencias de aminoácidos como residuos no idénticos.

15

La inhibición del enlace de CD154 con su receptor convenientemente se puede probar en diferentes ensayos, incluyendo los ensayos descritos posteriormente en la presente en el texto. El término "hasta el mismo grado" significa que las moléculas de referencia y equivalentes exhiben, sobre una base estadística, curvas de inhibición de enlace de CD154 esencialmente idénticas en uno de los ensayos referidos más adelante.

20

25 Por ejemplo, el ensayo utilizado puede ser un ensayo de enlace

competitivo exento de células para probar la inhibición de enlace de CD154 con CD40 en la presencia de las moléculas de enlace de CD154 de la invención.

De una manera más preferible, la molécula de enlace de CD154 de la invención es un anticuerpo anti-CD154 humano que comprende cuando menos un sitio de enlace que comprende:

a) una cadena pesada que comprende un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la mostrada en las SEQ ID No:2, empezando con el aminoácido en la posición 1, y terminando con el aminoácido en la posición 118, y la parte constante de una cadena pesada humana; y

b) una cadena ligera que comprende un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la mostrada en la SEQ ID No:4, empezando con el aminoácido en la posición 1, y terminando con el aminoácido en la posición 107, y la parte constante de una cadena ligera humana.

La parte constante de una cadena pesada humana puede ser del tipo γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , μ , α_1 , α_2 δ ó ϵ , de preferencia del tipo γ , más preferiblemente del tipo γ_1 ó γ_4 , mientras que la parte constante de una cadena ligera humana puede ser del tipo κ ó λ (que incluye los subtipos λ_1 , λ_2 , y λ_3), pero de preferencia es del tipo κ . La secuencia de aminoácidos de todas estas partes constantes se dan en Kabat y colaboradores, *ibid*.

Una molécula de enlace de CD154 de la invención se puede producir mediante técnicas de ADN recombinante. En vista de

esto, una o más moléculas de ADN que codifiquen la molécula de enlace, se pueden construir, colocar bajo secuencias de control apropiadas, y transferir a un organismo hospedero adecuado para su expresión.

5 De una manera muy general, de acuerdo con lo anterior, se proporcionan:

(i) moléculas de ADN que codifican una molécula de enlace de CD154 de un solo dominio de la invención, una cadena pesada o ligera o fragmentos de la misma de una molécula de enlace de
10 CD154 de la invención, y

(ii) el uso de las moléculas de ADN de la invención para la producción de una molécula de enlace de CD154 de la invención, mediante medios recombinantes.

El presente estado de la técnica es tal que el experto en
15 la materia puede sintetizar las moléculas de ADN de la invención, dada la información proporcionada en la presente, es decir, las secuencias de aminoácidos de las regiones hipervariables, y las secuencias de ADN que codifican para ellas. Un método para construir un gen de dominio variable, se describe,
20 por ejemplo, en la Patente Europea Número EP-A-239,400, y se puede resumir brevemente como sigue: Se clona un gen que codifique un dominio variable de un MAb de cualquier especificidad. Se determinan los segmentos de ADN que codifiquen las regiones de estructura e hipervariables, y se remueven los segmentos de
25 ADN que codifiquen las regiones hipervariables, de tal manera

que los segmentos de ADN que codifiquen las regiones de estructura se fusionen entre sí con sitios de restricción adecuados en las uniones. Los sitios de restricción se pueden generar en las posiciones apropiadas mediante mutagénesis de la molécula de ADN, mediante procedimientos convencionales. Se preparan casetes de CDR sintéticos de doble cadena mediante síntesis del ADN de acuerdo con las secuencias dadas en las SEQ ID Nos: 5, 6, 7, 8, 9, ó 10, respectivamente. A estos casetes se les proporcionan extremos pegajosos, de tal manera que se puedan ligar en las uniones de la estructura.

Además, no es necesario tener acceso al ARNm a partir de una línea celular de hibridoma productor con el objeto de obtener una construcción de ADN que codifique para los MAb de la invención. Por lo tanto, la Solicitud del TCP Número WO 90/07861 da instrucciones completas para la producción de un MAb mediante técnicas de ADN recombinante, dada solamente la información escrita con respecto a la secuencia de nucleótidos del gen. El método comprende la síntesis de un número de oligonucleótidos, su amplificación mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa, y su empalme para dar la secuencia de ADN deseada.

Los vectores de expresión que comprenden un promotor adecuado o genes que codifican las partes constantes de cadena pesada y ligera están públicamente disponibles. Por consiguiente, una vez que se prepara una molécula de ADN de la invención,

se puede transferir convenientemente a un vector de expresión apropiado. Las moléculas de ADN que codifican anticuerpos de una sola cadena también se pueden preparar mediante métodos convencionales, por ejemplo, como se describe en la Publicación Internacional Número WO 88/1649.

En vista de lo anterior, no es necesario ningún depósito de hibridoma o línea celular para cumplir con los criterios de suficiencia de la descripción.

En una modalidad particular de la invención, los medios recombinantes para la producción de una molécula de enlace de CD154 incluyen primera y segunda construcciones de ADN, como se describen enseguida:

La primera construcción de ADN codifica una cadena pesada o fragmento de la misma, y comprende:

a) una primera parte que codifica un dominio variable que comprende alternativamente regiones de estructura e hipervariables, siendo las regiones hipervariables, en secuencia, CDR1, CDR2, y CDR3, cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en las SEQ ID Nos:5, 6, y 7, respectivamente; empezando la primera parte con un codón que codifica el primer aminoácido del dominio variable, y terminando con un codón que codifica el último aminoácido del dominio variable, y

b) una segunda parte que codifica una parte constante de cadena pesada o fragmento de la misma, que empieza con un codón que codifica el primer aminoácido de la parte constante de la

cadena pesada, y termina con un codón que codifica el último aminoácido de la parte constante o fragmento de la misma, seguido por un codón de paro.

De preferencia, esta primera parte codifica un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID No: 2, empezando con el aminoácido en la posición 1, y terminando con el aminoácido en la posición 118. De una manera más preferible, la primera parte tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en las SEQ ID No:1, empezando con el nucleótido en la posición 1, y terminando con el nucleótido en la posición 354. También de preferencia, la segunda parte codifica la parte constante de un cadena pesada humana, más preferiblemente la parte constante de la cadena γ_1 humana. Esta segunda parte puede ser un fragmento de ADN de origen genómico (que comprenda intrones), o un fragmento de ADNc (sin intrones).

La segunda construcción de ADN codifica una cadena ligera o fragmento de la misma, y comprende:

a) una primera parte que codifica un dominio variable que comprende alternativamente regiones de estructura e hipervariables; siendo las regiones hipervariables CDR1', CDR2', y CDR3', cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en las SEQ ID Nos:8, 9, y 10, respectivamente; empezando esta primera parte con un codón que codifica el primer aminoácido del dominio variable, y terminando con un codón que codifica el último ami-

noácido del dominio variable, y

- b) una segunda parte que codifica un parte constante de cadena ligera o fragmento de la misma, que empieza con un codón que codifica el primer aminoácido de la parte constante de la cadena ligera, y termina con un codón que codifica el último aminoácido de la parte constante o fragmento de la misma, seguido por un codón de paro.

De preferencia, esta primera parte codifica un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID No:4, empezando con el aminoácido en la posición 1, y terminando con el aminoácido en la posición 107. De una manera más preferible, la primera parte tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID No:3, empezando con el nucleótido en la posición 1, y terminando con el nucleótido en la posición 321. También de preferencia, la segunda parte codifica la parte constante de una cadena ligera humana, más preferiblemente la parte constante de la cadena κ humana.

La invención también incluye moléculas de enlace de CD154, en donde uno o más de los residuos de CDR1, CDR2, CDR3, CDR1', CDR2', ó CDR3', se cambian desde los residuos mostrados en las SEQ ID Nos:5, 6, 7, 8, 9, ó 10, respectivamente; por ejemplo, mediante mutación, por ejemplo mutagénesis dirigida al sitio, de las secuencias de ADN correspondientes. La invención incluye las secuencias de ADN que codifican para estas moléculas de

enlace de CD154 cambiadas. En particular, la invención incluye moléculas de enlace de CD154, en donde uno o más residuos de CDR1', CDR2', ó CDR3' se han cambiado desde los residuos mostrados en las SEQ ID Nos. 8, 9, ó 10, respectivamente.

5 En las primera y segunda construcciones de ADN, las primera y segunda partes de preferencia se separan mediante un intrón. En el intrón localizado entre las primera y segunda partes, se puede insertar un potenciador. La presencia de este elemento genético que se transcribe pero no se traduce, se puede
10 requerir para una transcripción eficiente de la segunda parte. De una manera más preferible, las primera y segunda construcciones de ADN comprenden el potenciador de un gen de cadena pesada convenientemente de origen humano.

Cada una de las construcciones de ADN se colocan bajo el
15 control de secuencias de control adecuadas, en particular bajo el control de un promotor adecuado. Se puede utilizar cualquier clase de promotor, en el entendido de que se adapte al organismo hospedero al que se transfieran las construcciones de ADN para su expresión. Sin embargo, si la expresión va a tener
20 lugar en una célula de mamífero, se puede utilizar un promotor viral, por ejemplo un promotor de citomegalovirus (CMV), Sarcoma de Rous (RSV), o Leucemia de Murino (MLV).

El anticuerpo deseado se puede producir en un cultivo celular o en un animal transgénico. Un animal transgénico adecuado se puede obtener de acuerdo con los métodos convenciona-
25

les, los cuales, por ejemplo, incluyen microinyección en huevos de las primera y segunda construcciones de ADN colocadas bajo secuencias de control adecuadas que transfieran los huevos así preparados a las hembras pseudo-embarazadas apropiadas, y la selección de un descendiente que exprese el anticuerpo deseado.

Cuando se tienen que producir cadenas de anticuerpos en un cultivo celular, primero se deben insertar las construcciones de ADN en un solo vector de expresión, o en dos vectores de expresión separados pero compatibles, prefiriéndose la primera posibilidad.

De acuerdo con lo anterior, la invención también proporciona un vector de expresión capaz de replicarse en una línea celular procariótica o eucariótica, la cual comprenda cuando menos una de las construcciones de ADN descritas anteriormente.

Luego se transfiere cada vector de expresión que contenga una construcción de ADN a un organismo hospedero adecuado. Cuando se insertan por separado las construcciones de ADN en dos vectores de expresión, se pueden transferir por separado, es decir, un tipo de vector por célula, o se pueden co-transferir, prefiriéndose esta última posibilidad. Un organismo hospedero adecuado puede ser una bacteria, una levadura, o una línea celular de mamífero, prefiriéndose esta última. De una manera más preferible, la línea celular de mamífero es de origen linfoide, por ejemplo un mieloma, hibridoma, o una célula B inmortalizada normal, que convenientemente no exprese nin-

guna cadena pesada o ligera de ningún anticuerpo endógeno.

También se prefiere que el organismo hospedero contenga un gran número de copias de la secuencia codificante de la molécula de enlace de CD154 por célula. Si el organismo hospedero es una línea celular de mamífero, esta meta deseable se puede lograr mediante la amplificación del número de copias de las secuencias codificantes de acuerdo con los métodos convencionales. Estos métodos de amplificación con frecuencia consistente en la selección de una mayor resistencia a un fármaco, siendo esta resistencia codificada por el vector de expresión. Los sistemas preferidos para la expresión de las moléculas de enlace de CD154 de la invención incluyen los sistemas basados en glutamina-sintetasa (basados en GS), tales como los descritos en las Patentes Números EP 0256055 B, EP 0323997 B y la Solicitud de Patente Europea Número 89303964.4.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un proceso para la producción de una molécula de enlace de CD154, el cual comprende: (i) cultivar un organismo que transforme con un vector de expresión como se define anteriormente, y (ii) recuperar la molécula de enlace de CD154 a partir del cultivo.

En una modalidad preferida, se utilizan ratones transgénicos diseñados para expresar el repertorio IgG/k humano en lugar del repertorio de inmunoglobulina de murino (Fishwild y colaboradores, 1996, Nat Biotechnol., 14, 845-851), para generar anticuerpo para CD154 humano. Los ratones se inmunizan repetida-

mente con una proteína recombinante CD154 humana soluble consistente en dominio extracelular de CD154 humana fusionada con la cadena C κ de ratón (CD154- κ). Para hacer a la proteína más inmunogénica, la CD154 soluble se reticula con KLH. La iniciación con CD154:KLH es seguida por inmunizaciones repetidas con células de una línea celular humana recombinante que exprese constitutivamente la CD154 superficial. Las células de baz de estos ratones se immortalizan mediante tecnología de hibridoma convencional, y se obtienen células de hibridoma de murino, las cuales secretan anticuerpos anti-CD154 humano del tipo IgG1/ κ . Estos anticuerpos se seleccionan finalmente por reactividad a la CD154 humana, y por su capacidad para inhibir el enlace de CD154 con CD40, medido en un ensayo de tipo ELISA competitivo.

De acuerdo con la presente invención, se ha encontrado que la molécula de enlace de CD154, como se da a conocer en la presente, por ejemplo un anticuerpo humano anti-humano, por ejemplo el anticuerpo ABI793, tiene una especificidad de epítipo de antígeno deseable. Por consiguiente, se ha encontrado que el ABI793 reconoce un epítipo tanto sobre el antígeno CD154 humano como de mono cinomolgo; este epítipo es diferente de los epítipos respectivos que son reconocidos por los Mabs 5c8 y 24-31 anti-CD154 humano de ratón. De una manera particular, aunque el Mabs 5c8 anti-humano de ratón solamente reconoce un epítipo formado sobre el CD154 humano trimérico, el anticuerpo humano anti-ABI793 humano se enlaza con un epítipo presente tanto so-

bre el CD154 humano monomérico como trimérico.

Los anticuerpos, en particular los anticuerpos quiméricos e injertados con CDR, y especialmente los anticuerpos humanos, de preferencia los anticuerpos monoclonales que tienen especificidad de enlace para un epítipo antigénico de CD154 humano
5 diferente de los epítopos respectivos que son reconocidos por los Mabs 5c8 y 24-31 anti-CD154 humano de ratón, siendo los anticuerpos capaces de interferir con, modular, o inhibir las interacciones fisiológicas de CD154/CD40, y el uso de estos anticuerpos, por ejemplo en la prevención de rechazo de injerto de
10 órganos, o en la prevención o tratamiento de desórdenes o enfermedades autoinmunes o inflamatorias, aterosclerosis, o enfermedad de Alzheimer, son novedosos y se incluyen dentro del alcance de la presente invención.

De acuerdo con lo anterior, la invención también proporciona una molécula de enlace de CD154, de preferencia un anticuerpo humano, que se enlace específicamente y forma un complejo con un epítipo de antígeno humano presente sobre el CD154 humano monomérico, así como trimérico, siendo este epítipo el
20 epítipo de antígeno con el que se enlaza específicamente el ABI793.

Las moléculas de enlace de CD154 de acuerdo con la presente invención, por ejemplo los anticuerpos (referidos posteriormente en la presente como el Anticuerpo de la Invención), exhiben valiosas propiedades farmacológicas, por ejemplo, interfie-
25

ren con, modulan, o inhiben las interacciones fisiológicas de CD154/CD40, por ejemplo como se demuestra en los métodos de prueba convencionales *in vitro* e *in vivo*, por ejemplo como se describe enseguida:

5

1. Inhibición del Enlace de CD154:CD40

Se prueba la capacidad para inhibir el enlace de CD154 con CD40 en un ensayo de enlace competitivo exento de células. Se inmoviliza el CD154 humano soluble recombinante (es decir, la porción extracelular del CD154 humano fusionada con C_κ de ratón) sobre placas de microtitulación, y las placas se incuban, en la presencia o en ausencia de un inhibidor supuesto, con CD40 humano soluble recombinante biotinilado. La fracción del CD40 enlazada con el CD154 se determina fluorimétricamente utilizando estreptavidina marcada con Eu como el reactivo de detección. En este ensayo, el Anticuerpo de la Invención tiene una capacidad inhibidora expresada como IC₅₀, es decir, la concentración necesaria para lograr una inhibición del 50 por ciento del enlace, dentro de 5 a 150 nanogramos/mililitro. Se ha encontrado que el ABI793 tiene una IC₅₀ de 75 ± 11 nanogramos/mililitro.

La inhibición del enlace de CD154:CD40 mediante el anticuerpo de la invención, por ejemplo ABI793, es específica, debido a que no inhibe el enlace de TNF:TNF-RI cuando se prueba en concentraciones que son hasta más de 50 veces más altas que la IC₅₀ encontrada para el enlace de CD154:CD40 (CD154 y CD40

25

son miembros de la familia de TNF y del receptor de TNF (TNF-R), es decir, comparten homología con TNF y TNF-R, respectivamente). La inhibición del enlace de TNF:TNF-RI se realiza por medio de un ensayo de enlace competitivo establecido en el mismo formato que el ensayo de enlace de CD154:CD40.

2. Inhibición de la Proliferación de Células B Impulsada por CD154/IL-4

La proteína CD154 de ratón o humana recombinante soluble, en combinación con IL-4, simula células B humanas purificadas que expresan constitutivamente el CD40 superficial, para proliferarse y producir inmunoglobulina. Brevemente, se establecen cultivos en cajas de cultivo de tejido de fondo plano de 96 pozos (Costar) en RPMI (Gibco), complementado con piruvato de Na (1 mM; Gibco), aminoácidos no esenciales MEM (Gibco), 2-mercaptoetanol (50 μ M), L-glutamina (2 mM), gentamicina (50 microgramos/mililitro; Gibco), bacto-asparagina (20 microgramos/mililitro Difco), insulina humana (5 microgramos/mililitro; Sigma), transferrina humana (40 microgramos/mililitro; Sigma), y suero fetal de becerro seleccionado (10 por ciento, Hyclone Labs, UT). En los ensayos convencionales, se estimulan células B purificadas (2.5×10^5 /mililitro; cultivos de 0.2 mililitros) durante 5 días por triplicado, mediante CD154 humano recombinante (3 microgramos/mililitro) e IL-4 (100 unidades/mililitro). Para evaluar la proliferación de las células B, las cé-

lulas se impulsan en el día 4 con 1 mCi/pozo de ^3H -TdR, y se determina la recuperación de radioactividad 16 horas después. El SD entre los cultivos triplicados es de <20 por ciento. Los cultivos de control se estimulan con CD154 de murino. En este
5 ensayo, el Anticuerpo de la Invención inhibe la proliferación de células B dependiente de CD154: se ha encontrado que el ABI793 tiene una IC_{50} de 73 ± 21 nanogramos/mililitro.

10 3. Inducción de proliferación de células B mediante la cepa Cowan I de *Staphylococcus aureus* (SAC)

La SAC activa aproximadamente el 20 por ciento de las células B periféricas humanas mediante la reticulación de la inmunoglobulina superficial. Se estimulan células B purificadas (2.5×10^5 /mililitro; cultivos de 0.2 mililitros) por triplica-
15 do durante 10 días mediante SAC soluble (Sigma; dilución de 1:10,000), e IL-2 (Chiron; 300 unidades/mililitro). Para evaluar la proliferación de células B, las células se impulsan en el día 4 con 1 mCi/pozo de ^3H -TdR, y se determina la recuperación de radioactividad 16 horas después. La SD entre los cul-
20 tivos triplicados es de <20 por ciento. La proliferación de células B desencadenada con SAC, en combinación con IL-2, es decir, la proliferación de células B independiente de CD154, no es inhibida por el Anticuerpo de la Invención, por ejemplo ABI793, en una concentración aproximadamente 40 veces más alta
25 que la IC_{50} .

4. Aloinjertos Renales

Se hace el trasplante entre pares de donadores-receptores genéticamente distintos de monos cinomolgos, como se determina mediante Reacción de Linfocitos Mixtos (MLR). El aloinjerto se implanta utilizando técnicas microvasculares convencionales para crear una anastomosis extremo con costado entre la arteria renal del donador y la aorta distal del receptor, así como entre la vena renal del donador y la vena cava del receptor. Luego se crea una ureteroneocistostomía primaria. La nefrectomía nativa bilateral se completa antes del cierre. El Anticuerpo, por ejemplo ABI793, se administra intravenosamente, en una dosis de 20 miligramos/kilogramo en el momento del trasplante (Día 0), y luego en los días postoperatorios 1, 4, 11, 18, y 28, seguidos por una sola dosis cada 28 días durante 6 meses. Se ha encontrado que los monos así tratados muestran los efectos deseados.

Por consiguiente el Anticuerpo de la Invención es útil en el tratamiento y/o en la prevención de enfermedades o desórdenes en donde la modulación y/o interferencia de CD154 con, o la inhibición de las interacciones de CD154:CD40 sea terapéuticamente benéfica, en la prevención de procesos inflamatorios asociados con macrófagos, o en el tratamiento de enfermedades en donde sea deseable la supresión de las respuestas de anticuerpos a los antígenos, por ejemplo la inhibición de proliferación

y diferenciación de células B, la inhibición de respuestas de células T, la inducción o modulación de tolerancia de células T o inhibición del crecimiento de células tumorales que expresen el antígeno CD154. Estas condiciones incluyen desórdenes autoinmunes y no autoinmunes. Las condiciones específicas que son potencialmente tratables mediante la administración del Anticuerpo de la Inversión incluyen, por ejemplo, aspergilosis broncopulmonar alérgica; anemia hemolítica autoinmune; *Acanthosis nigricans*; dermatitis alérgica por contacto; enfermedad de Addison; dermatitis atópica; *Alopecia areata*; *Alopecia universalis*; Amiloidosis; púrpuras anafilactoide; reacción anafilactoide; anemia aplástica; angioedema, hereditario o idiopático; espondilitis anquilosante; arteritis, craneal, de células gigantes, o temporal; arteritis, de Takayasu; Asma; Ataxia-telangiectasia; ooforitis autoinmune; orquitis autoinmune; insuficiencia poliendócrina autoinmune; enfermedad de Behcet; enfermedad de Berger; enfermedad de Buerger; penfigo buloso; candidiasis, crónica mucocutánea; síndrome de Caplan; síndrome de posterior a infarto al miocardio; síndrome posterior a pericardiotomía; carditis; prurito Celiac; enfermedad de Chagas; síndrome de Chediak-Higashi; enfermedad de Churg-Strauss; síndrome de Cogan; enfermedad de aglutinina fría; síndrome de CREST; enfermedad de Crohn; crioglobulinemia; alveolitis fibrosante criptogénica; dermatitis herpetiformis; dermatomiositis; diabetes mellitus; Síndrome de Diamond-Blackfan; síndrome de DiGeor-

ge; lupus eritematoso discoide; fascitis eosinofílica; episcleritis; *Drythema elevatum diutinum*; eritema marginatum, multiforme o nodoso; fiebre del Mediterráneo Familiar; síndrome de Felty; fibrosis pulmonar, glomerulonefritis, anafilactoide, autoinmune, post-estreptococal, o post-trasplante; glomerulopatía, membranosa; síndrome de Goodpasture; enfermedad del injerto contra el hospedero; granulocitopenia, inmuno-mediada; granuloma anular; granulomatosis, alérgica; miositis granulomatosa; enfermedad de Grave; tiroiditis de Hashimoto; enfermedad hemolítica del recién nacido; hemocromatosis, idiopática; púrpura de Henoch-Schoenlein; hepatitis, crónica activa y crónica progresiva; histiocitosis C; síndrome hipereosinofílico; púrpura trombocitopénica idiopática; síndrome de Job; dermatomiositis juvenil; artritis reumatoide juvenil (artritis crónica juvenil); enfermedad de Kawasaki; queratitis, queratoconjuntivitis sicca; síndrome de Landry-Guillain-Barre-Strohl; lepra, lepromatosa; síndrome de Loeffler; síndrome de Lyell; enfermedad de Lyme; granulomatosis linfomatoide; mastocitosis, sistémica; enfermedad de tejido conectivo mixto; mononeuritis multiplex; síndrome de Muckle-Wells; síndrome de nodo linfático mucocutáneo; reticulohistiocitosis multicéntrica; esclerosis múltiple; miastenia gravis; micosis fungoides; vasculitis necrotizante, sistémica; síndrome nefrótico; síndrome de traslape; paniculitis; hemoglobinuria fría paroxismal; hemoglobinuria nocturna paroxismal; penfigoide; penfigo; penfigo eritematoso, fliaceo

o vulgaris; enfermedad del criador de palomas; neumonitis, hipersensibilidad; poliartritis nodosa; polimialgia reumática; polimiositis; polineuritis, idiopática; polineuropatía familiar portuguesa; pre-eclampsia/eclampsia; cirrosis biliar primaria; 5 esclerosis sistémica progresiva (Escleroderma); psoriasis; artritis psoriática; proteinosis o fibrosis alveolar pulmonar, fenómeno/síndrome de Raynaud; tiroiditis de Reidel; síndrome de Reiter, policondritis recurrente, fiebre reumática; artritis reumatoide; sarcoidosis; escleritis; colangitis esclerosante; 10 enfermedad del suero; síndrome de Sezary; síndrome de Sjogren; síndrome de Stevens-Johnson; enfermedad de Still; panencefalitis esclerosante subaguda; oftalmia simpática, sífilis; lupus eritematoso sistémico; rechazo de trasplante; tuberculosis; colitis ulcerativa; colitis ulcerativa; enfermedad de tejido conectivo no diferenciado; urticaria, crónica o fría; uveitis; 15 vitiligo; enfermedad de Weber-Christian; granulomatosis de Wegener; síndrome de Wiskott-Aldrich; así como aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer, infecciones de VIH, o desórdenes linfoproliferativos, por ejemplo leucemias (por ejemplo, leucemia de células T) o linfomas (por ejemplo linfoma de células T). rechazo de trasplante significa el rechazo de un alo- xeno- 20 injerto, por ejemplo células, tejidos, u órganos sólidos, por ejemplo islotes pancreáticos, médula ósea, tejido córneo, tejido neuronal, corazón, pulmón, corazón-pulmón combinados, riñón, 25 hígado, intestino, páncreas, tráquea, esófago.

Para los usos anteriores, la dosificación requerida, por supuesto variará dependiendo del modo de administración, de la condición particular que se vaya a tratar, y del efecto deseado. En general, se indica que se obtienen resultados satisfactorios en dosificaciones de aproximadamente 0.5 a 100 miligramos/kilogramo de peso del cuerpo. Los Anticuerpos de la Invención se pueden administrar mediante cualquier vía convencional, en particular enteralmente, por ejemplo oralmente, por ejemplo en la forma de cápsulas, o parenteralmente, por ejemplo en la forma de una solución o suspensión inyectable, tópicamente o mediante inhalación (inhalación intranasal, u oral).

Las composiciones farmacéuticas que comprenden un Anticuerpo de la Invención en asociación con cuando menos un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, se pueden fabricar de una manera convencional, mezclando con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona además:

1. Un método para prevenir o tratar desórdenes, enfermedades, o condiciones tales como se indican anteriormente, por ejemplo la inhibición de una respuesta inmune mediada por interacciones de células positivas para CD154 con células positivas para CD40, la inhibición de proliferación y diferenciación de células B o de respuestas de células T, la inducción o modulación de tolerancia de células B o prevención de procesos infla-

matorios asociados con macrófagos, en un sujeto que necesite dicho tratamiento, cuyo método comprende administrar a este sujeto una cantidad no tóxica efectiva de una molécula de enlace de CD154 como se da a conocer en la presente, por ejemplo

5 ABI793;

2. El uso de una molécula de enlace de CD154 como se da a conocer en la presente, por ejemplo ABI793, en un método tal como se indica anteriormente;

3. Una composición farmacéutica, por ejemplo para utilizarse en un método tal como se indica anteriormente, la cual comprende una molécula de enlace de CD154 como se da a conocer en la presente, por ejemplo ABI793, en asociación con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable para la misma;

10

4. Una molécula de enlace de CD154 como se da a conocer en la presente, por ejemplo ABI793, para utilizarse en la preparación de una composición farmacéutica útil en un método como se indica anteriormente.

15

El Anticuerpo de la Invención se puede administrar como el único ingrediente activo, o en conjunto con, por ejemplo, como un adyuvante para, otros fármacos, en regímenes inmunosupresores o inmunomoduladores u otros agentes anti-inflamatorios, por ejemplo para el tratamiento o la prevención de rechazo agudo o crónico de alo- o xenoinjerto, o desórdenes inflamatorios o autoinmunes, o un agente quimioterapéutico. Por ejemplo, el An-

20

25

ticuerpo de la Invención se puede utilizar en combinación con un inhibidor de calcineurina, por ejemplo ciclosporina A ó FK 506; una lactona macrocíclica que tenga propiedades inmunosupresoras, por ejemplo rapamicina o 40-O-(2-hidroxietil)-rapamicina; una ascomicina que tenga propiedades inmunosupresoras, por ejemplo ABT-281, ASM981, etcétera; corticosteroides; ciclofosfamida; azatiopreno; metotrexato; FTY720; leflunomida; mizoribina; ácido micofenólico; micofenolato-mofetil; 15-desoxiespergualina o un homólogo, análogo, o derivado inmunosupresor de la misma; anticuerpos monoclonales inmunosupresores, por ejemplo anticuerpos monoclonales para CD40 ó para otros receptores de leucocitos, por ejemplo MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD25, CD28, CD80, CD86, CD45 ó CD58 ó sus ligandos, o un anticuerpo monoclonal anti-BB1; otros compuestos inmunomoduladores, por ejemplo una molécula de enlace recombinante que tenga cuando menos una porción del dominio extracelular de CTLA4 o un mutante del mismo, por ejemplo cuando menos una porción extracelular de CTLA4 ó un mutante de la misma unido con una secuencia que no sea de la proteína CTLA4, por ejemplo CTLA4Ig (por ejemplo como la designada ATCC 68629) o un mutante de la misma, por ejemplo LEA29Y; inhibidores de moléculas de adición, por ejemplo antagonistas de LFA-1, antagonistas de ICAM-1 ó 3, antagonistas de VCAM-4, o antagonistas de VLA-4; o un agente quimioterapéutico, por ejemplo paclitaxel, gemcitabina, cisplatino, doxorubicina, ó 5-fluorouracilo.

Cuando el Anticuerpo de la Invención se administre en conjunto con otra terapia inmunosupresora/inmunomoduladora, anti-inflamatoria, o quimioterapéutica, por supuesto, las dosificaciones del compuesto inmunosupresor, inmunomodulador, anti-inflamatorio, o quimioterapéutico co-administrado variarán dependiendo del tipo de co-fármaco empleado, por ejemplo si es un esteroide o un inhibidor de calcineurina, sobre el fármaco específico empleado, sobre la condición que se esté tratando, etcétera. De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona, en toda un aspecto adicional:

5. Un método como se define anteriormente, el cual comprende la co-administración, por ejemplo de una manera concomitante o en secuencia, de una cantidad no tóxica terapéuticamente efectiva de una molécula de enlace de CD154 como se da a conocer en la presente, por ejemplo ABI793, y cuando menos una segunda sustancia de fármaco, por ejemplo un fármaco inmunosupresor, inmunomodulador, anti-inflamatorio, o quimioterapéutico, por ejemplo como se indica anteriormente.

6. Una combinación farmacéutica, por ejemplo un estuche, para utilizarse en cualquier método como se define anteriormente, la cual comprende: a) un primer agente que sea una molécula de enlace de CD154 como se da a conocer en la presente, por ejemplo ABI793, en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, y b) cuando menos un co-agente, por ejemplo un fármaco inmunosupresor, inmunomodulador, anti-inflamatorio, o

quimioterapéutico. El estuche puede comprender instrucciones para su administración.

Los términos "co-administración" o "administración combinada", o similares, como se utilizan en la presente, abarcan la administración de los agentes terapéuticos seleccionados a un solo paciente, y pretenden incluir regímenes de tratamiento en donde los agentes no sean necesariamente administrados por la misma vía de administración o al mismo tiempo.

El término "combinación farmacéutica", como se utiliza en la presente, significa un producto que resulta de la mezcla o combinación de más de un ingrediente activo, incluyen tanto combinaciones fijas como no fijas de los ingredientes activos. El término "combinación fija" significa que los ingredientes activos, por ejemplo ABI793 y un co-agente, se administran ambos a un paciente de una manera simultánea en la forma de una sola entidad o dosificación. El término "combinación no fija" significa que los ingredientes activos, por ejemplo ABI793 y un co-agente, se administran ambos a un paciente como entidades separadas, ya sea de una manera simultánea, concurrente, o en secuencia, sin límites de tiempo específicos, en donde esta administración proporcione niveles terapéuticamente efectivos de los dos compuestos en el cuerpo del paciente. Esto último también se aplica a una terapia de cóctel, por ejemplo la administración de 3 ó más ingredientes activos.

De preferencia, el Anticuerpo de la Invención es un anti-

cuerpo humano, más preferiblemente el anticuerpo ABI793, o un equivalente directo del mismo.

La invención se describe además a manera de ilustración solamente en los siguientes ejemplos, los cuales se refieren a las Figuras acompañantes.

La Figura 1 da las secuencias de ADN (SEQ ID No.:1) y de aminoácidos (SEQ ID No:2) para la cadena pesada.

La Figura 2 da las secuencias de ADN (SEQ ID No:3) y de aminoácidos (SEQ ID No:4) para la cadena ligera.

La Figura 3 da las SEQ ID Nos: 5, 6, 7, 8, 9, Y 10.

La Figura 4 se refiere al análisis de epítomos, y muestra los resultados del experimento de bloqueo cruzado utilizando células Jurkat D1.1: el teñido con mAbs marcado con FTC como se indica, solo (línea regular) o después de una preincubación previa con el mAb anti-CD154 no marcado indicado (línea en negrillas).

La Figura 5 se refiere al análisis de epítomos, y muestra los resultados del experimento de bloqueo cruzado utilizando células T humanas activadas: como en la Figura 4, pero utilizando células T humanas positivas para CD4 purificadas, que se activaron durante 6 horas con PMA/ionomicina antes del teñido.

La Figura 6 se refiere al análisis de epítomos, y muestra los resultados del experimento de bloqueo cruzado utilizando células T de mono cinomolgo activadas: como en la Figura 4, pero utilizando células T de mono cinomolgo positivas para CD4

purificadas, que se activaron durante 4 horas con PMA/ionomicina antes del teñido.

La Figura 7 muestra la detección del CD154 humano recombinante trimérico.

5 La Figura 8 muestra la detección del CD154 humano recombinante monomérico.

Pista M: marcador pre-teñido; Pista 1: CD154 humano: proteína de fusión de ratón C_x.

10 Pista 2: parte extracelular bacterianamente expresada de CD154 humano.

Ejemplo 1: Generación del hibridoma y purificación del anticuerpo

El ratón genéticamente diseñado 66 (Medarex Inc. Annadale, NJ) se inmuniza con una proteína recombinante CD154 humana soluble como se describe anteriormente (50 microgramos) subcutáneamente en varios sitios en adyuvante. El ratón se refuerza cinco veces adicionales, teniendo la última inyección tres días antes de la fusión. En el día de la fusión, el ratón 66 se sacrifica mediante inhalación de CO₂, y se fusionan las células de bazo (4.1 x 10⁷) mediante un método de rutina utilizando PEG 4000, con un número igual de células PAI-O, una línea celular de mieloma de ratón. Las células fusionadas se recubren en 624 pozos (1 mililitro/pozo) conteniendo una capa de alimentación de células peritoneales de ratón (ratón Balb C), en RPMI 1640 com-

15

20

25

pletado con HAT, suero fetal de becerro inactivado por calor al 10 por ciento, 5×10^5 M, β -mercaptoetanol.

Los sobrenadantes se recolectan y se prueban en ELISA, y se rastrean para determinar los anticuerpos monoclonales que reaccionan con CD154. Se identifican 5 anticuerpos monoclonales de la subclase IgG/ κ . La clonación se hace utilizando 4 placas de microtitulación de 96 pozos, recubriendo 0.5 células por pozo. Después de dos semanas, los pozos se inspeccionan con un microscopio invertido. El sobrenadante se recolecta de los pozos positivos para el crecimiento y la producción de anticuerpos monoclonales anti-CD154, y se evalúa mediante ELISA. Los hibridomas positivos se subclonan, y el anticuerpo producido se aísla mediante afinidad a partir de 1-2 litros de sobrenadante. El hibridoma # 207.2 se selecciona, produciendo el Anticuerpo ABI793, y el Anticuerpo producido se purifica mediante cromatografía por afinidad sobre una columna de proteína A.

El anticuerpo ABI793 se caracteriza mediante las secuencias de ADN y de aminoácidos dadas en la Figura 1 y en la Figura 2.

Ejemplo 2: Determinación de constante de equilibrio de disociación

La constante de índice de asociación y disociación para el enlace de CD154 humano recombinante con ABI793, se determina

mediante análisis BIAc re. El ABI793 se inmoviliza, y se mide el enlace del CD154 recombinante soluble (CD154-κ) en un rango de concentración de 10 a 160 nM, mediante resonancia de plasmón superficial. El formato seleccionado representa una interacción monovalente. El análisis de los datos se realiza utilizando el software de evaluación BIA.

Constante de índice de asociación	$[M^{-1} \times s^{-1}]$ (n=3)	$(2.34 \pm 0.13) \times 10^4$
Constante de índice de disociación	$[s^{-1}]$ (n=3)	$(5.38 \pm 0.43) \times 10^4$
Constante de equilibrio de disociación K_D	$[nM]$ (n=3)	23.1 ± 2.8

Ejemplo 3: Análisis de Epítomos

Se realizan experimentos de bloqueo cruzado en la presencia de los MAbs 5c8 y 24-31 anti-CD154 de ratón: Las células T que expresan CD154 superficial se tiñen con uno de los tres, para este propósito, Mabs anti-CD154 marcados con FTC. La preincubación con células Jurkat D1.1 (que expresan constitutivamente CD154 ¿) con 24-31 no marcado antes del teñido con FTC-5c8, elimina la señal fluorescente, es decir, bloquea el enlace de FTC-5c8 de la misma manera que lo hace la preincubación con el 5c8 no marcado (Figura 4A contra 4B). Esto indica que los 5c8 y 24-31 reconocen un epítopo mutuo o yuxtapuesto sobre el

antígeno CD154. En contraste, la preincubación con ABI793 no marcado no afecta el enlace del 5c8 marcado con FTC (Figura 4D).

5 Esto demuestra que el ABI793 reconoce un epítipo sobre el antígeno CD154 que es diferente de los epítipos reconocidos por los Mabs 5c8 y 24-31 anti-CD154 humano de ratón. Estos resultados se confirman utilizando células T positivas para CD154 aisladas, activadas con PMA/ionomicina, ya sea de origen humano (Figura 5) o bien de mono cinomolgo (Figura 6). En estos ensa-
10 yos de enlace, utilizando el mismo procedimiento que se da a conocer para las células Jurkat, el ABI793 reconoce un epítipo tanto sobre el antígeno CD154 humano como de mono cinomolgo, que es diferente de los epítipos respectivos reconocidos por los Mabs 5c8 y 24-31 anti-CD154 humano de ratón.

15 El CD154 se expresa en células T como un homotrímero no covalente; de la misma manera, el CD154 soluble biológicamente activo, forma espontáneamente un homotrímero no covalente en solución. Para analizar si el epítipo reconocido por ABI793 depende de la estructura trimérica intacta del CD154, se realizan análisis de mancha de ranura (Figura 7) y Western blot (Fi-
20 gura 8). La Figura 7 muestra que el CD154 trimérico (es decir, CD154 recombinante soluble, biológicamente activo) manchado sobre una membrana de nitrocelulosa, es reconocido por ABI793, así como por 5c8 y 24-31. Esto contrasta con los resultados de
25 los análisis Western blot. Bajo las condiciones de electrofo-

resis en gel de poliacrilamida (PAGE), el CD154 migra como un monómero. Después del manchado en una membrana de nitrocelulosa, solamente el ABI793 puede revelar la proteína de fusión CD154 de aproximadamente 40 kD (Figura 8 "ABI793", pista 1, fecha "A"), así como el dominio extracelular bacterianamente expresado de 15 kD del CD154 (Figura 8, "ABI793", pista 2, flecha "B"; la proteína de aproximadamente 30 kD que se realiza en esta pista podría ser potencialmente un dímero de CD154). En contraste, 5c8 y 24-31 son incapaces de revelar la proteína recombinante CD154, aunque estos anticuerpos se enlazan con la CD154 recombinante manchada directamente sobre una membrana de nitrocelulosa (Figura 7), es decir, con la forma trimérica. Esto indica que el ABI793 reconoce tanto el monómero como el trímero de CD154, mientras que 5c8 y 24-31 se enlazan exclusivamente con el trímero. Esto corrobora los descubrimientos de los estudios FACS que demuestran que el ABI793 reconoce un epítipo sobre el antígeno CD154 que es diferente de aquéllos reconocidos por 5c8 y 14-31.

Detección del CD154 humano recombinante trimérico:

20 1 microgramo de CD154 soluble recombinante (es decir, la porción extracelular del CD154 humano fusionada con C_κ) se mancha en ranura sobre un filtro de nitrocelulosa. Después de bloquear la membrana con BSA al 5 por ciento, se incuban tiras individuales durante 1 hora con diferentes concentraciones de
25 los anticuerpos anti-CD154 humano (2.0; 1.0; 0.5; 0.25; 0.125

microgramos/mililitro). Luego se revela el anticuerpo enlazado mediante una incubación de 45 minutos con IgG de cabra anti-humana específica de la cadena γ y acoplada con fosfatasa alcalina (para ABI793), o bien IgG de cabra anti-ratón (para 5c8 y 24-31), seguido por una reacción estándar con BCIP/NBT. Para controlar la reacción cruzada con la parte de C_{α} de ratón del CD154 recombinante, se incuban tiras con el segundo anticuerpo respectivo solamente.

10 **Detección de CD154 humano recombinante monomérico:**

Cinco series de muestra idénticas del CD154 humano recombinante, ya sea en la forma de una proteína de fusión consistente en la parte extracelular de CD154 fusionada con C_{α} de ratón, o bien la porción extracelular solamente, expresadas en *E. coli* se pasan por electroforesis sobre un gel de gradiente PAGE al 4-20 por ciento. Después de mancharse sobre nitrocelulosa, la membrana se corta, y las tiras individuales se incuban en secuencia durante 1 hora cada una, con los anticuerpos anti-CD154 humano, como se indica. Luego se revela el anticuerpo enlazado mediante una incubación de 45 minutos con un segundo anticuerpo específico de cadena γ y acoplado con fosfatasa alcalina (IgG de cabra anti-ratón e IgG de cabra anti-humano, respectivamente), seguido por una reacción estándar con BCIP/NBT.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de enlace de CD154, la cual comprende un sitio de enlace de antígeno que comprende cuando menos un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1 CDR2, y CDR3, teniendo la CDR1 la secuencia de aminoácidos Asn-Phe-Ala-Phe-Asn, teniendo la CDR2 la secuencia de aminoácidos Arg-Ile-Leu-Pro-Ser-Leu-Asp-Ile-Ala-Ser, y teniendo la CDR3 la secuencia de aminoácidos Glu-Val-Asp-Gly-Gly-Phe; y sus equivalentes la directos.

2. Una molécula de enlace de CD154 que comprende ambos dominios variables de cadena pesada (V_H) y de cadena ligera (V_L), en donde esta molécula de enlace de CD154 comprende cuando menos un sitio de enlace de antígeno que comprende:

a) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1 CDR2, y CDR3, teniendo la CDR1 la secuencia de aminoácidos Asn-Phe-Ala-Phe-Asn, teniendo la CDR2 la secuencia de aminoácidos Arg-Ile-Leu-Pro-Ser-Leu-Asp-Ile-Ala-Ser, y teniendo la CDR3 la secuencia de aminoácidos Glu-Val-Asp-Gly-Gly-Phe, y

b) un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L), el cual comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1', CDR2', y CDR3', teniendo las CDR1' la secuencia de aminoácidos Arg-Ala-Ser-Gln-Gly-Ile-Ser-Ser-Trp-Leu-Ala,

teniendo la CDR2' la secuencia de aminoácidos Ala-Ala-Ser-Ser-Leu-Gln-Ser, y teniendo la CDR3' la secuencia de aminoácidos Gln-Gln-Tyr-Asn-Ser-Tyr-Pro-Phe-Tyr;

y sus equivalentes directos. *cla.*

5 3. Una molécula de enlace de CD154 de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, la cual es un anticuerpo humano.

4. Una molécula de enlace de CD154, la cual comprende cuando menos un sitio de enlace que comprende:

10 a) una cadena pesada que comprende un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica *cla.* a la mostrada en las SEQ ID No:2, empezando con el aminoácido en la posición 1, y terminando con el aminoácido en la posición 118, y la parte constante de una cadena pesada humana; y

15 b) una cadena ligera que comprende un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica *cla.* a la mostrada en la SEQ ID No:4, empezando con el aminoácido en la posición 1, y terminando con el aminoácido en la posición 107, y la parte constante de una cadena ligera humana.

20 5. Una molécula de enlace de CD154 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para utilizarse en la inhibición de una respuesta inmune mediada por las interacciones de las células positivas para CD154 con células positivas para CD40, en el tratamiento y/o en la prevención de enfermedades o desórdenes en donde la modulación de CD154 y/o inter-
25 ferencia con, o la inhibición de las interacciones de

CD154:CD40, sea terapéuticamente benéfica, en la prevención de los procesos inflamatorios asociados con macrófagos, o en el tratamiento de enfermedades en donde sea deseable la supresión de las respuestas de anticuerpos a los antígenos.

5 6. Una molécula de enlace de CD154 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para utilizarse en la fabricación de un medicamento para la inhibición de una respuesta inmune mediada por las interacciones de las células po-
10 sitivas para CD154 con células positivas para CD40, el tratamiento y/o en la prevención de enfermedades o desórdenes en donde la modulación de CD154 y/o interferencia con, o la inhibición de las interacciones de CD154:CD40, sea terapéuticamente benéfica, en la prevención de los procesos inflamatorios asociados con macrófagos, o el tratamiento de enfermedades en don-
15 de sea deseable la supresión de las respuestas de anticuerpos a los antígenos. JP

7. Una construcción de ADN que codifica una cadena pesada o un fragmento de la misma, la cual comprende: la

a) una primera parte que codifica un dominio variable que
20 comprende alternativamente regiones de estructura e hipervariables, siendo las regiones hipervariables, en secuencia, CDR1, CDR2, y CDR3, cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en las SEQ ID Nos:5, 6, y 7, respectivamente; empezando la primera
25 parte con un codón que codifica el primer aminoácido del dominio variable, y terminando con un codón que codifica el último

aminoácido del dominio variable, y

- b) una segunda parte que codifica una parte constante de cadena pesada o fragmento de la misma, que empieza con un codón que codifica el primer aminoácido de la parte constante de la cadena pesada, y termina con un codón que codifica el último aminoácido de la parte constante o fragmento de la misma, seguido por un codón de paro.

8. Una construcción de ADN que codifica una cadena ligera o un fragmento de la misma, la cual comprende: 30

- 10 a) una primera parte que codifica un dominio variable que comprende alternativamente regiones de estructura e hipervariables; siendo las regiones hipervariables CDR1', CDR2', y CDR3', cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en las SEQ ID Nos: 8, 9, y 10, respectivamente; empezando esta primera parte con un codón que codifica el primer aminoácido del dominio variable, y terminando con un codón que codifica el último aminoácido del dominio variable, y

- 20 b) una segunda parte que codifica un parte constante de cadena ligera o fragmento de la misma, que empieza con un codón que codifica el primer aminoácido de la parte constante de la cadena ligera, y termina con un codón que codifica el último aminoácido de la parte constante o fragmento de la misma, seguido por un codón de paro.

25 9. Un vector de expresión capaz de replicarse en una línea celular procariótica o eucariótica, el cual comprende cuan-

do menos una construcción de ADN de acuerdo con la reivindicación 7 ó 8.

10. Una composición farmacéutica para utilizarse en la inhibición de una respuesta inmune mediada por interacciones de células positivas para CD154 con células positivas para CD40, en el tratamiento y/o prevención de enfermedades o desórdenes en donde la modulación de CD154 y/o la interferencia con, o la inhibición de las interacciones de CD154:CD40, sea terapéuticamente benéfica, en la prevención de los procesos inflamatorios asociados con macrófagos, o en el tratamiento de enfermedades en donde sea deseable la supresión de las respuestas de los anticuerpos a los antígenos, la cual comprende una molécula de enlace de CD154 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en asociación con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable para la misma.

11. Una combinación farmacéutica que comprende:

a) un primer agente que es una molécula de enlace de CD154, y

b) cuando menos un co-agente. *cual*

RESUMEN

5

Se proporciona una molécula de enlace de CD154, en particular un anticuerpo para CD154 humano, especialmente un anticuerpo humano para CD154 humano, en donde las CDRs de la
10 aminoácidos como se definen, para utilizarse en el tratamiento y/o en la prevención de enfermedades o desórdenes en donde sea terapéuticamente benéfica la modulación de, y/o la interferencia con, CD154, o la inhibición de las interacciones de CD154:CD40.

FIGURA 1

SEQ. ID No. 1

1 50
 CAGGTCCAGC TGGTGCAGTC TGGGGCTGAG GTGCAGAAGC CTGGGTCCTC

 51 100
 GGTGAAGGTC TCCTGCAAGG CTTCTGGAGG CACCTTCAGC AACTTTGCTT

 101 150
 TCAACTGGGT GCGACAGGTC CCTGGACAAG GGCTTGAGTG GATGGGAAGG

 151 200
 ATCCTCCCTA GTCTTGATAT AGCAAGCTAC GCACAGAAGT TCCAGGACAG

 201 250
 AGTCACGATT ACCGCGGACA AATCCACGAG CACAGCCTAC ATGGAGTTGA

 251 300
 GCAGCCTGAG ATCTGAGGAC ACGGCCATGT ATTACTGTGC GAGAGAGGTG

 301 350
 GATGGAGGGG GTTTTGACTA CTGGGGCCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC

 351 354
 CTC A

SEQ. ID. No.2

1 10 20 30 40 50
 QVQLVQSGAEVQKPGSSVKVSCKASGGTFS ~~NEAFN~~ WVRQVPGQGLEWNG ~~ELP~~SLDIAS
 CDR1 CDR2
 60 70 80 90 100 110 118
 YAQKFQDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDYNTYCAR ~~EVDGGGE~~ DYNGQGTIVTVSS
 CDR3

FIGURA 2

SEQ. ID. No. 3

1 50
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCA CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA
51 100
CAGAGTCACC ATCACTTGTC GGGCGAGTCA GGGTATTAGC AGCTGGTTAG
101 150
CCTGGTATCA GCAGAAACCA GAGAAAGCCC CTAAGTCCCT GATCTATGCT
151 200
GCATCCAGTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA AGGTTTCAGCG GCAGTGGATC
201 250
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATTTTG
251 300
CAACTTATTA CTGCCAACAG TATAATAGTT ACCCGTTCAC TTTCGGCGGA
301 321
GGGACCAAGG TGGAGATCAA A

SEQ. ID No.4

1 10 20 30 40 50
DIQNTQSPSSLSASVGDRTITC ~~AAEQGISNLA~~ WYQQKPEKAPKSLIY ~~AAEELQK~~
CDR1' CDR2'
60 70 80 90 100 107
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC ~~QQYNSEYPT~~ FGGGTKVEIK
CDR3'

FIGURA 3

SEQ. ID. No. 5

CDR1: NFAFN

SEQ. ID. No. 6

CDR2: RILPSLDIAS

SEQ. ID. No. 7

CDR3: EVDGGGF

SEQ. ID. No. 8

CDR1': RASQGISSWLA

SEQ. ID. No. 9

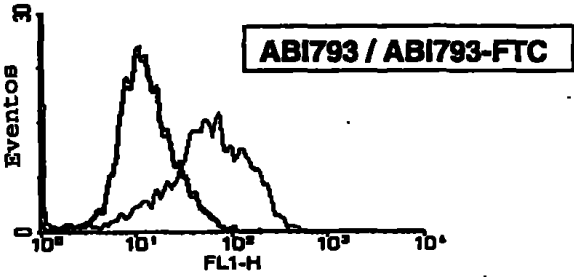
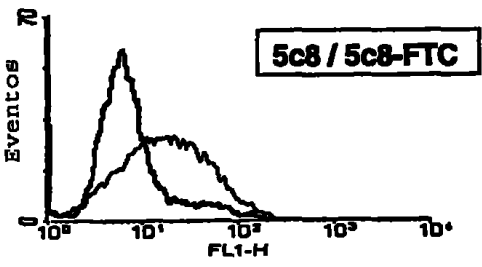
CDR2': AASSLQS

SEQ. ID. No. 10

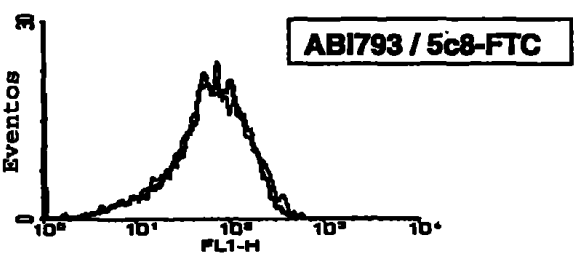
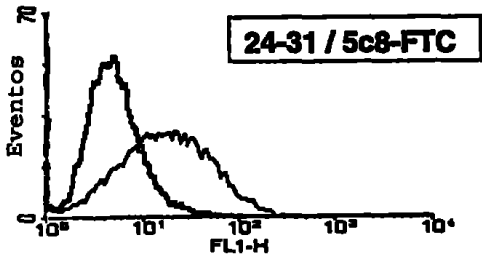
CDR3': QQYNSYPFT

FIGURA 4

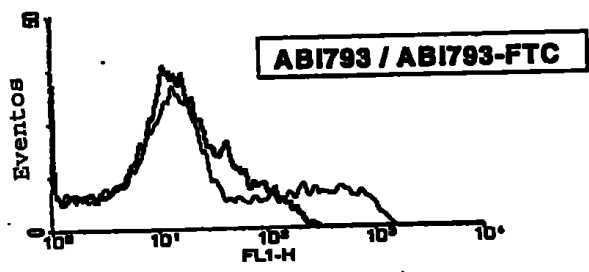
C



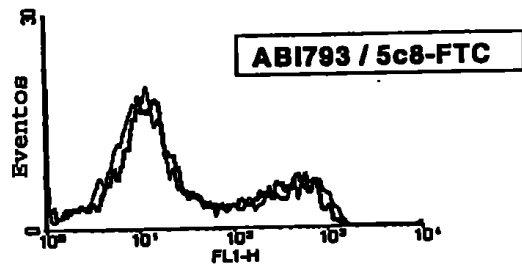
D



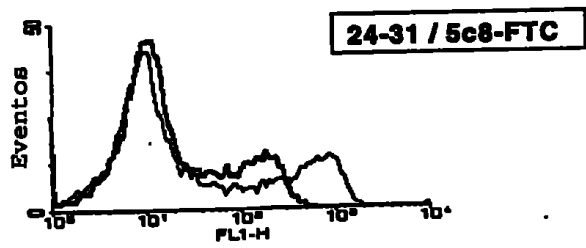
A



C



B



D

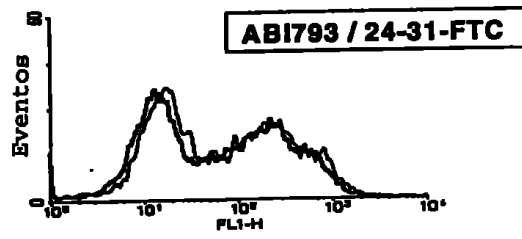
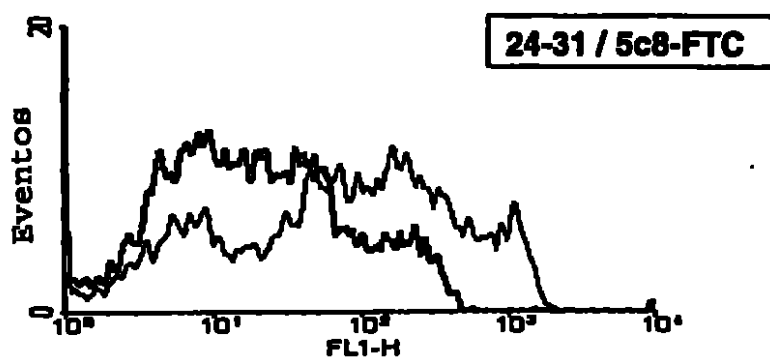


FIGURA 5

FIGURA 6

A



B



C

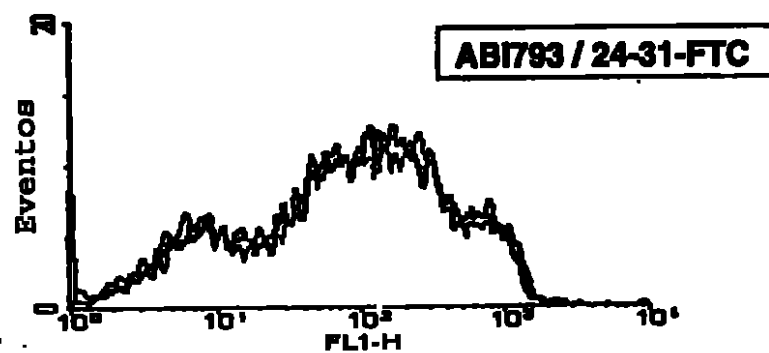
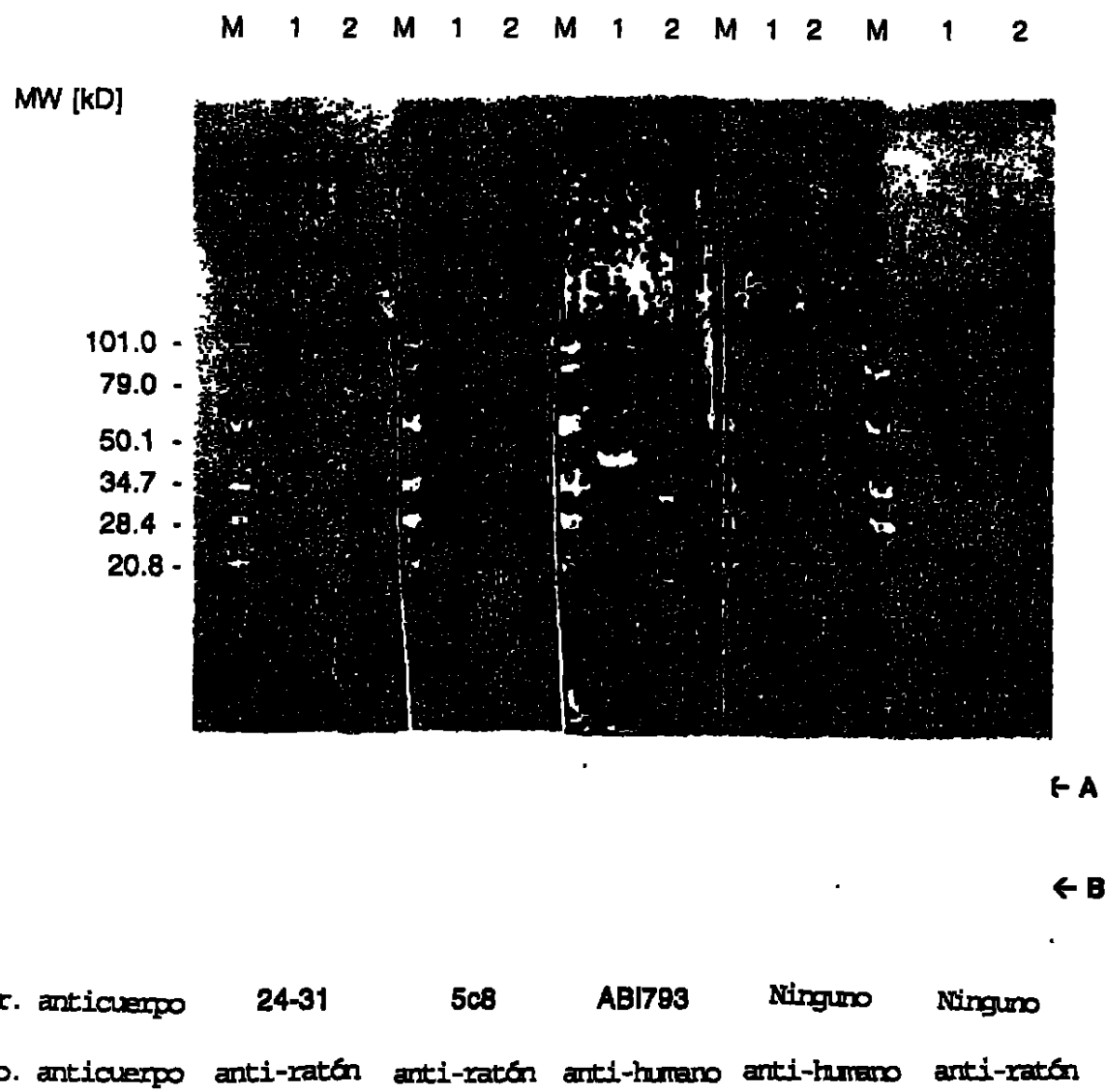


FIGURA 7



Anticuerpo 2.0 1.0 0.5 0.25 0.125 Ninguno
Anti-CD 154
[µg/ml]

FIGURA 8



REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PATENTE DE INVENCION [☒]

MODELO DE UTILIDAD [☐]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [☐]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [☐]
- Descripción de la invención [☐]
- Dibujos de ser estos pertinentes [☐]
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas [☐]

COMPLETA [☒]

INCOMPLETA [☐]

DISEÑO INDUSTRIAL [☐]

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial [☐]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [☐]
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño [☐]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [☐]

COMPLETA [☐]

INCOMPLETA [☐]

ESQUEMA DE TRAZADO [☐]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado [☐]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [☐]
- Representación gráfica del esquema de trazado [☐]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [☐]

COMPLETA [☐]

INCOMPLETA [☐]

Firma Responsable

Fecha:

Carrera 13 No. 27-00 Pto 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@ide.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

INFORME DE PROTOCOLO

Expediente 01-20763.

Fecha: 3 de mayo del 2001.

Se certifica que:

Desde fecha 16 de Abril de 1997,
del folio 90.643 al folio 90.650 del libro
de Protocolo N° 311, obra el poder N° 17398
conferido por NOVARTIS AG (NOVARTIS SA) (NOVARTIS INC)
domiciliado(a) en Basilea, Suiza
al doctor Jimena Escobar Uribe y/o Ignacio Escobar
Uribe.

Facultad para desistir y sustituir si.

Revisado 202022.

2020
Bogotá, D.C.

Doctora
JIMENA ESCOBAR URIBE
Apoderada

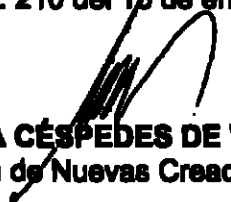
REFERENCIA:	Radicación No.	01-20763
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio No.	1390
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

- Debe allegar copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por el inventor al solicitante o a su causante (art. 28-k, Dec 486/2000).

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el artículo 8 de la Resolución Reglamentaria No. 210 del 15 de enero del 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

10 MAYO 2001

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.

Se recuerda al interesado que debe presentar, dentro de los dieciséis meses siguientes contados a partir de la fecha de presentación de la solicitud cuya prioridad se invoca, copia de la misma certificada por la autoridad que la expidió y, en los casos en que haya lugar, la traducción simple del capítulo reivindicatorio. El incumplimiento de este plazo, acarreará la pérdida de la prioridad invocada.

202027/202022

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 382 2695
E-mail: Info@sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

1002/50/01
7/10/05/2007