

6564

ESCOBAR - URIBE ASOCIADOS

A B O G A D O S

Carrera 11A No. 94-76 Of. 305 - P.O. Box 94948, Bogotá, Colombia, S.A.
Tels.: (571) 6162051 - 6162061 - 6161899 - 6161869
Fax: (571) 6161889

2440/P

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 01020763 00000002 Folios: 76
Fecha (RUB): 2001-05-16 15:30:39
Trámite : 692 PATENTES D 1 REGISTRO/ 444 RESPUESTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Ref.: Expediente No. 01.020.763
Solicitud de Patente a nombre de
NOVARTIS AG

Yo, JIMENA ESCOBAR URIBE, identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la carrera 11 A No. 94-76, of. 305-306, obrando como apoderada de la sociedad Novartis AG, domiciliada en Basilea, Suiza, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta a su oficio No. 1390 notificado por fijación en lista el día 10 de mayo de 2001, me permito manifestar lo siguiente:

1. Anexo al presente memorial el documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por los inventores a favor de mi mandante.

De conformidad con las normas legales vigentes, artículo 1 de la Resolución 210 de 2001, expedida por el Superintendente de Industria y Comercio y artículo 2 de la Convención de la Haya, los documentos en inglés que se pretendan aportar como parte de los trámites de propiedad industrial ante la Superintendencia de Industria y Comercio no requieren traducción. Por otro lado, la legalización consular y/o diplomática de los documentos expedidos en el extranjero no es necesaria. Por lo tanto, el documento de cesión anexo a este memorial es válidamente presentado en idioma inglés, cuya versión en español se encuentra a continuación del texto en inglés, y con la correspondiente Apostilla.

2. Copia certificada de la solicitud de Patente Número 0006398.2 presentada en Gran Bretaña el día 16 de marzo de 2000, con la debida traducción.

67
65

A este mismo respecto, debe tenerse en cuenta que en la segunda página de la copia en mención la Oficina de Patentes correspondiente certificó la fecha de presentación de esa solicitud, cumpliéndose de esta forma todos y cada uno de los requisitos establecidos en el inciso segundo del artículo 10 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

Espero con esto haber dado cabal cumplimiento a lo solicitado por ese despacho y de conformidad con lo indicado en los artículos 3º., inciso 3, 35 inciso 2 y 59 inciso 2 del CCA, al analizar este memorial, atentamente solicito se traten todas las cuestiones planteadas con motivo del mismo.

Señor Superintendente,


JIMENA ESCOBAR URIBE
C.C.39.779.452 de usaquén
T.P. 68228
Cód. 5376

**D CUMENTO DE CESIÓN
ASSIGNMENT DOCUMENT**

El (los) suscrito (s), en su calidad de inventor (es) de

declara (an) que cede (n) y traspasa (n) todos los derechos que les correspondan en y sobre el invento atrás mencionado a NOVARTIS AG, una compañía suiza constituida y existente bajo las leyes de Suiza, domiciliada en CH-4002 Basilea, Suiza, en cuanto se refiere a la República de Colombia.

The undersigned, as inventor (s) of

Human Antibodies to CD154

hereby declare (s) that assign (s) all the rights in and to the aforementioned invention to NOVARTIS AG, a Swiss company incorporated and existing in conformity with the laws of Switzerland, domiciled at CH-4002 Basel, Switzerland, as far as the Republic of Colombia is concerned.

Franco Di Padova

Franco E. DI PADOVA
domiciled at
Kluenenfeldstrasse 45
4127 Birsfelden
Switzerland

FIRMA DEL CEDENTE
domiciliado en

Walter Schuler, 01.02.2007

Walter SCHULER
domiciled at
Kirchstr. 49
79639 Grenzach-Wyhlen
Germany

FIRMA DEL CEDENTE
domiciliado en

Attestation

I, the undersigned notary public in Basel, Switzerland, certify herewith the authenticity of the signatures of Mr. **Franco E. Di Padova**, Italian citizen, residing in Birsfelden, Switzerland, and Mr. **Walter Schuler**, German citizen, residing in Grenzach-Wyhlen, Germany; the authenticity of the signatures was established by comparison.

BASEL, this 7th (seventh) of February 2001 (twothousandandone).



M. Staehelin, Notar

Dr. M. Staehelin
Notar

Leg. Prot.: 229/2001

APOSTILLE

(Convention de la Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Schweiz (Suisse)

Diese öffentliche Urkunde

2. ist unterschrieben von *Dr. iur. M. Staehelin*

3. in seiner Eigenschaft als *Notar*

4. sie ist versehen mit dem Siegel/Stempel des (der) *Genaranten*

Revisiert

5. in Basel (Bâle) *-7. Feb. 2001*

7. durch die Staatskanzlei des Kantons Basel-Stadt.

8. unter Nr. *1250/2036*

9. Siegel/Stempel:

10. Unterschrift:

Hanna Lauener
Hanna Lauener





2440



INVESTOR IN PEOPLE

69
67

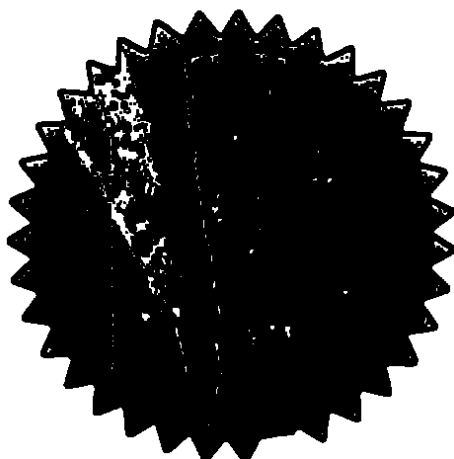
The Patent Office
Concept House
Cardiff Road
Newport
South Wales
NP10 8QQ

I, the undersigned, being an officer duly authorised in accordance with Section 74(1) and (4) of the Deregulation & Contracting Out Act 1994, to sign and issue certificates on behalf of the Comptroller-General, hereby certify that annexed hereto is a true copy of the documents as originally filed in connection with the patent application identified therein.

In accordance with the Patents (Companies Re-registration) Rules 1982, if a company named in this certificate and any accompanying documents has re-registered under the Companies Act 1980 with the same name as that with which it was registered immediately before re-registration save for the substitution as, or inclusion as, the last part of the name of the words "public limited company" or their equivalents in Welsh, references to the name of the company in this certificate and any accompanying documents shall be treated as references to the name with which it is so re-registered.

In accordance with the rules, the words "public limited company" may be replaced by p.l.c., plc, P.L.C. or PLC.

Re-registration under the Companies Act does not constitute a new legal entity but merely subjects the company to certain additional company law rules.



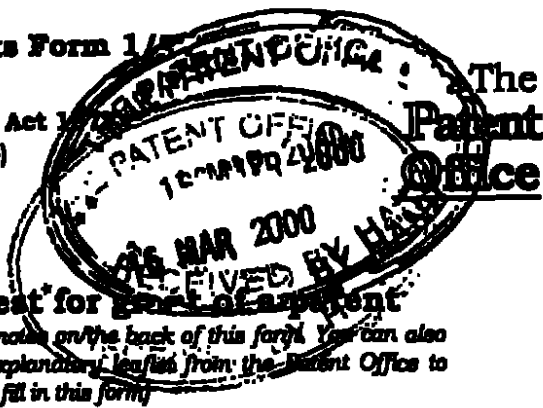
Signed *AmBrewer*

Dated 7 February 2001

20
68

Patents Form 1/77

Patents Act 1977
(Rule 16)



1/77

Request for grant of a patent

(See the notes on the back of this form. You can also get an explanatory leaflet from the Patent Office to help you fill in this form.)

The Patent Office
Cardiff Road
Newport
Gwent NP9 1RH

1. Your reference 431288P1

2. Patent application number
(The Patent Office will fill in this part)

UU06398.2

16 MAR 2000

7MAR00 E522085-3 000524

PO177700 U.00-UU06398.2

3. Full name, address and postcode of the
or of each applicant
(underline all surnames)

NOVARTIS AG
SCHWARZWALDALLEE 216
4058 BASEL
SWITZERLAND

Patent ADP number (if you know it)

If the applicant is a corporate body,
give the country/state of its
incorporation

SWITZERLAND

7125487002

4. Title of invention ORGANIC COMPOUNDS

5. Name of your agent (if you have one)

Address for service in the United
Kingdom to which all correspondence
should be sent
(including the postcode)

B.A. YORKE & CO.
CHARTERED PATENT AGENTS
COOMB HOUSE, 7 ST. JOHN'S ROAD
ISLEWORTH
MIDDLESEX TW7 8NH

Patents ADP number (if you know it)

1800001

6. If you are declaring priority from one
or more earlier patent applications,
give
the country and the date of filing of
the or of each of these earlier
applications and (if you know it) the or
each application number

Country

Priority application
number
(if you know it)

Date of filing
(day/month/year
)

7. If this application is divided or
otherwise derived from an earlier UK
application, give the number and the
filing date of the earlier application

Number of earlier
application

Date of filing
(day/month/year)

8. Is a statement of inventorship and of
right to grant of a patent required in
support of this request? (Answer 'Yes' if:

Yes

a) any applicant named in part 3 is not an
inventor, or

b) there is an inventor who is not named as
an applicant, or

c) any named applicant is a corporate
body.

(see note (d))

Patents Form 1/77

5

Patents Form 1/77

9. Enter the number of sheets for any of the following items you are filing with this form. Do not count copies of the same document

Continuation sheets of this form

Description 21

Claim(s) 1

Abstract

Drawing(s) 5 *XS*

10. If you are also filing any of the following, state how many against each item.

Priority documents

Translations of priority documents

Statement of inventorship and right to grant of a patent (*Patents Form 7/77*)

Request for preliminary examination and search (*Patents Form 9/77*)

Request for substantive examination (*Patents Form 10/77*)

Any other documents
(please specify)

11. I/We request the grant of a patent on the basis of this application

Signature

Date

B.A. Yorke & Co

B.A. Yorke & Co.

18.03.00

12. Name and daytime telephone number of person to contact in the United Kingdom

Mrs. E. Cheetham
020 8560 5847

Warning

After an application for a patent has been filed, the Comptroller of the Patent Office will consider whether publication or communication of the invention should be prohibited or restricted under Section 22 of the Patents Act 1977. You will be informed if it is necessary to prohibit or restrict your invention in this way. Furthermore, if you live in the United Kingdom, Section 23 of the Patents Act 1977 stops you from applying for a patent abroad without first getting written permission from the Patent Office unless an application has been filed at least 6 weeks beforehand in the United Kingdom for a patent for the same invention and either no direction prohibiting publication or communication has been given, or any such direction has been revoked.

Notes

- If you need help to fill in this form or you have any questions, please contact the Patent Office on 0645 500505.
- Write your answers in capital letters using black ink or you may type them.
- If there is not enough space for all the relevant details on any part of this form, please continue on a separate sheet of paper and write "see continuation sheet" in the relevant part(s). Any continuation sheet should be attached to this form.
- Once you have filled in the form you must remember to sign and date it.
- For details of the fee and ways to pay please contact the Patent Office.

Patents Form 1/77

Organic Compounds

This invention relates to antibodies to human CD154 (CD154 being also known as gp39 or CD40-L) and to the use of such antibodies in the treatment and/or prevention of diseases or disorders wherein CD154 modulation and/or inhibition of the CD154:CD40 interactions is therapeutically beneficial, e.g. the prevention of cell, tissue or organ graft rejection, the prevention or treatment of autoimmune diseases, atherosclerosis or Alzheimer disease.

Cell-surface molecules which mediate contact-dependent helper-effector functions of T cells are important for inducing immune responses which require T cell help. For example, the interactions of CD154 on T cells with CD40 on B cells play a central role in activating B cell responses to antigens. It has also been shown that the inhibition of the interaction between CD154 and its receptor CD40 prevents T cell activation and may induce antigen-specific T cell tolerance. However CD154/CD40 interactions are not restricted to T and B cells or APCs.

Antibodies to CD154 have been proposed as agents blocking the CD154/CD40 interactions: two humanized anti-human CD154 monoclonal antibodies (MAbs) derived from mouse anti-human CD154 MAbs 5c8 and 24-31 are known. However there still exists a need for an effective method of blocking the CD154/CD40 interaction, e.g. in order to prevent or treat the disorders and diseases as indicated, for example to induce specific tolerance in allotransplantation, e.g. ideally by blocking co-stimulatory signals while at the same time allowing antigen-recognition and T cell receptor signalling.

We have now prepared improved antibodies to CD154 for use in the prevention or treatment of disorders, diseases or conditions as described hereinafter.

Accordingly the invention provides a CD154 binding molecule which comprises an antigen binding site comprising at least one immunoglobulin heavy chain variable domain (HV) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1, CDR2 and CDR3, said CDR1 having the amino acid sequence Asn-Phe-Ala-Phe-Asn, said CDR2 having the amino acid sequence Arg-Ile-Leu-Pro-Ser-Leu-Asp-Ile-Ala-Ser, and said CDR3 having the amino acid sequence Glu-Val-Asp-Gly-Gly-Gly-Phe; and direct equivalents thereof.

In a first aspect the invention provides a single domain CD154 binding molecule comprising an isolated immunoglobulin heavy chain which comprises a heavy chain variable domain (HV) as defined above.

In a second aspect the invention also provides a CD154 binding molecule comprising both heavy (HV) and light chain (LV) variable domains in which said CD154 binding molecule comprises at least one antigen binding site comprising:

- a) an immunoglobulin heavy chain variable domain (HV) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1, CDR2 and CDR3, said CDR1 having the amino acid sequence Asn-Phe-Ala-Phe-Asn, said CDR2 having the amino acid sequence Arg-Ile-Leu-Pro-Ser-Leu-Asp-Ile-Ala-Ser, and said CDR3 having the amino acid sequence Glu-Val-Asp-Gly-Gly-Gly-Phe, and
- b) an immunoglobulin light chain variable domain (LV) which comprises in sequence' hypervariable regions CDR1', CDR2' and CDR3', said CDR1' having the amino acid sequence Arg-Ala-Ser-Gln-Gly-Ile-Ser-Ser- Trp-Leu-Ala, said CDR2' having the amino acid sequence Ala-Ala-Ser-Ser-Leu-Gln-Ser, and said CDR3' having the amino acid sequence Gln-Gln-Tyr-Asn-Ser-Tyr-Pro-Phe-Tyr;

and direct equivalents thereof.

Unless otherwise indicated, any polypeptide chain is hereafter described as having an amino acid sequence starting at the N-terminal extremity and ending at the C-terminal extremity. When the antigen binding site comprises both the HV and LV domains, these may be located on the same polypeptide molecule or, preferably, each domain may be on a different chain, the HV domain being part of an immunoglobulin heavy chain or fragment thereof and the LV being part of an immunoglobulin light chain or fragment thereof.

By "CD154 binding molecule" is meant any molecule capable of binding to the CD154 antigen either alone or associated with other molecules. The binding reaction may be shown by standard methods including, for example, a bioassay for determining the inhibition of CD154 binding to its receptor or any kind of binding assays, with reference to a negative control test in which an antibody of unrelated specificity, e.g. an anti-CD25 antibody, is used. Advantageously, the binding of the CD154 binding molecules of the invention to CD154 may be shown in a competitive binding assay.

Examples of antigen binding molecules include antibodies as produced by B-cells or hybridomas and chimeric, CDR-grafted or human antibodies or any fragment thereof, e.g. $F(ab')_2$ and Fab fragments, as well as single chain or single domain antibodies.

A single chain antibody consists of the variable domains of antibody's heavy and light chains covalently bound by a peptide linker usually consisting of from 10 to 30 amino acids, preferably from 15 to 25 amino acids. Therefore, such a structure does not include the constant part of the heavy and light chains and it is believed that the small peptide spacer should be less antigenic than a whole constant part. By "chimeric antibody" is meant an antibody in which the constant regions of heavy or light chains or both are of human origin while the variable domains of both heavy and light chains are of non-human (e.g. murine) origin or from a different human antibody. By "CDR-grafted antibody" is meant an antibody in which the hypervariable regions (CDRs) are derived from a donor antibody, such as a non-human (e.g. murine) antibody or a different human antibody, while all or substantially all the other parts of the immunoglobulin e.g. the constant regions and the more conserved parts of the variable domains, i.e. the framework regions, are derived from an acceptor antibody, e.g. an antibody of human origin. A CDR-grafted antibody may however retain a few amino acids of the donor sequence in the parts of the framework regions adjacent to the hypervariable regions. By "human antibody" is meant an antibody in which the constant and variable regions of both the heavy and light chains are all of human origin, or substantially identical to sequences of human origin, not necessarily from the same antibody and includes antibodies produced by mice in which the murine immunoglobulin variable and constant part genes have been replaced by their human counterparts, e.g. as described in general terms in EP 0546073 B1, USP 5545806, USP 5569825, USP 5625126, USP 5633425, USP 5661016, USP 5770429, EP 0 438474 B1 and EP 0 463151 B1.

Particularly preferred CD154 binding molecules of the invention are human antibodies especially the ABI793 antibody as hereinafter described in the Examples.

Thus in preferred human antibodies the variable domains of both heavy and light chains are of human origin, for instance those of the ABI793 antibody which are shown in SEQ. ID. No. 1 and SEQ. ID. No. 2. The constant region domains preferably also comprise suitable human constant region domains, for instance as described in "Sequences of proteins of

immunological interest", Kabat E.A. et al, US department of health and human services, Public health service, National Institute of Health.

Hypervariable regions may be associated with any kind of framework regions, though preferably are of human origin. Suitable framework regions are described in Kabat E.A. et al, *ibid*. The preferred heavy chain framework is a human heavy chain framework, for instance that of the ABI793 antibody which is shown in SEQ. ID. No. 1. It consists in sequence of FR1, FR2, FR3 and FR4 regions. In a similar manner, SEQ. ID. No. 2 shows the preferred ABI793 light chain framework which consists, in sequence, of FR1', FR2', FR3' and FR4' regions.

Accordingly, the invention also provides a CD154 binding molecule which comprises at least one antigen binding site comprising either a first domain having an amino acid sequence substantially identical to that shown in SEQ. ID. No. 1 starting with amino acid at position 1 and ending with amino acid at position 118 and a second domain having an amino acid sequence substantially identical to that shown in SEQ. ID. No. 2, starting with amino acid at position 1 and ending with amino acid at position 107.

Monoclonal antibodies raised against a protein naturally found in all humans are typically developed in a non-human system e.g. in mice. As a direct consequence of this, a xenogenic antibody as produced by a hybridoma, when administered to humans, elicits an undesirable immune response which is predominantly mediated by the constant part of the xenogenic immunoglobulin. This clearly limits the use of such antibodies as they cannot be administered over a prolonged period of time. Therefore it is particularly preferred to use single chain, single domain, chimeric, CDR-grafted, or especially human antibodies which are not likely to elicit a substantial allogenic response when administered to humans.

In view of the foregoing, a more preferred CD154 binding molecule of the invention is selected from a human anti CD154 antibody which comprises at least

- a) an immunoglobulin heavy chain or fragment thereof which comprises (i) a variable domain comprising in sequence the hypervariable regions CDR1, CDR2 and CDR3 and (ii) the constant part or fragment thereof of a human heavy chain; said CDR1 having the amino acid sequence Asn-Phe-Ala-Phe-Asn, said CDR2 having the amino acid

- 5 -

- sequence Arg-Ile-Leu-Pro-Ser-Leu-Asp-Ile-Ala-Ser and said CDR3 having the amino acid sequence Glu-Val-Asp-Gly-Gly-Gly-Phe, and
- b) an immunoglobulin light chain or fragment thereof which comprises (i) a variable domain comprising in sequence the CDR1', CDR2' and CDR3' hypervariable regions and (ii) the constant part or fragment thereof of a human light chain, said CDR1' having the amino acid sequence Arg-Ala-Ser-Gln-Gly-Ile-Ser-Ser-Trp-Leu-Ala, said CDR2' having the amino acid sequence Ala-Ala-Ser-Ser-Leu-Gln-Ser, and said CDR3' having the amino acid sequence Gln-Gln-Tyr-Asn-Ser-Tyr-Pro-Phe-Tyr, and direct equivalents thereof.

Alternatively, a CD154 binding molecule of the invention may be selected from a single chain binding molecule which comprises an antigen binding site comprising

- a) a first domain comprising in sequence the hypervariable regions CDR1, CDR2 and CDR3, said hypervariable regions having the amino acid sequences as shown in SEQ. ID. No. 1;
- b) a second domain comprising the hypervariable regions CDR1', CDR2' and CDR3', said hypervariable regions having the amino acid sequences as shown in SEQ. ID. No. 2; and
- c) a peptide linker which is bound either to the N-terminal extremity of the first domain and to the C-terminal extremity of the second domain or to the C-terminal extremity of the first domain and to the N-terminal extremity of second domain; and direct equivalents thereof.

As it is well known, minor changes in an amino acid sequence such as deletion, addition or substitution of one or several amino acids may lead to an allelic form of the original protein which has substantially identical properties.

Thus, by the term "direct equivalents thereof" is meant either any single domain CD154 binding molecule (molecule X)

- (i) in which the hypervariable regions CDR1, CDR2 and CDR3 taken as a whole are at least 80% homologous, preferably at least 90% homologous, more preferably at least 95% homologous to the hypervariable regions as shown in SEQ. ID. No. 1, and
- (ii) which is capable of inhibiting the binding of CD154 to its receptor substantially to the same extent as a reference molecule having framework regions identical to those of

molecule X but having hypervariable regions CDR1, CDR2 and CDR3 identical to those shown in SEQ. ID. No. 1;

or any CD154 binding molecule having at least two domains per binding site (molecule X')

- (i) in which the hypervariable regions CDR1, CDR2 and CDR3, CDR1', CDR2' and CDR3' taken as a whole are at least 80% homologous, preferably at least 90% homologous, more preferably at least 95% homologous to the hypervariable regions as shown in SEQ. ID. No. 1 and 2, and
- (ii) which is capable of inhibiting the binding of CD154 to its receptor substantially to the same extent as a reference molecule having framework regions and constant parts identical to molecule X', but having hypervariable regions CDR1, CDR2, CDR3, CDR1', CDR2' and CDR3' identical to those shown in SEQ. ID. No. 1 and 2.

In the present description amino acid sequences are at least 80% homologous to one another if they have at least 80% identical amino acid residues in a like position when the sequence are aligned optimally, gaps or insertions in the amino acid sequences being counted as non-identical residues.

The inhibition of the binding of CD154 to its receptor may be conveniently tested in various assays including such assays as described hereinafter in the text. By the term "to the same extent" is meant that the reference and the equivalent molecules exhibit, on a statistical basis, essentially identical CD154 binding inhibition curves in one of the assays referred to below.

For example, the assay used may be a cell-free competitive binding assay to test the binding inhibition of CD154 to CD40 in the presence of the CD154 binding molecules of the invention.

Most preferably, the human anti-CD154 antibody comprises at least

- a) one heavy chain which comprises a variable domain having an amino acid sequence substantially identical to that shown in SEQ. ID. No. 1 starting with the amino acid at position 1 and ending with the amino acid at position 118 and the constant part of a human heavy chain; and

- b) one light chain which comprises a variable domain having an amino acid sequence substantially identical to that shown in SEQ. ID. No. 2 starting with the amino acid at position 1 and ending with the amino acid at position 107 and the constant part of a human light chain.

The constant part of a human heavy chain may be of the γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , μ , α_1 , α_2 , δ or ϵ type, preferably of the γ type, more preferably of the γ_1 or γ_4 type, whereas the constant part of a human light chain may be of the κ or λ type (which includes the λ_1 , λ_2 and λ_3 subtypes) but is preferably of the κ type. The amino acid sequence of all these constant parts are given in Kabat et al Ibid.

A CD154 binding molecule of the invention may be produced by recombinant DNA techniques. In view of this, one or more DNA molecules encoding the binding molecule must be constructed, placed under appropriate control sequences and transferred into a suitable host organism for expression.

In a very general manner, there are accordingly provided

- (i) DNA molecules encoding a single domain CD154 binding molecule of the invention, a heavy or light chain or fragments thereof of a CD154 binding molecule of the invention, and
- (ii) the use of the DNA molecules of the invention for the production of a CD154 binding molecule of the invention by recombinant means.

The present state of the art is such that the skilled worker in the art is able to synthesize the DNA molecules of the invention given the information provided herein i.e. the amino acid sequences of the hypervariable regions and the DNA sequences coding for them. A method for constructing a variable domain gene is for example described in EP-A-239,400 and may be briefly summarized as follows: A gene encoding a variable domain of a MAb of whatever specificity is cloned. The DNA segments encoding the framework and hypervariable regions are determined and the DNA segments encoding the hypervariable regions are removed so that the DNA segments encoding the framework regions are fused together with suitable restriction sites at the junctions. The restriction sites may be generated at the appropriate positions by mutagenesis of the DNA molecule by standard procedures. Double stranded

synthetic CDR cassettes are prepared by DNA synthesis according to the sequences given in SEQ. ID. No. 1 or 2. These cassettes are provided with sticky ends so that they can be ligated at the junctions of the framework

Furthermore, it is not necessary to have access to the mRNA from a producing hybridoma cell line in order to obtain a DNA construct coding for the MAbs of the invention. Thus PCT application WO 90/07861 gives full instructions for the production of a MAb by recombinant DNA techniques given only written information as to the nucleotide sequence of the gene. The method comprises the synthesis of a number of oligonucleotides, their amplification by the PCR method, and their splicing to give the desired DNA sequence.

Expression vectors comprising a suitable promoter or genes encoding heavy and light chain constant parts are publicly available. Thus, once a DNA molecule of the invention is prepared it may be conveniently transferred in an appropriate expression vector. DNA molecules encoding single chain antibodies may also be prepared by standard methods, for example, as described in WO 88/1649.

In view of the foregoing no hybridoma or cell line deposit is necessary to comply with the criteria of sufficiency of description.

In a particular embodiment of the invention, the recombinant means for the production of a CD154 binding molecule includes first and second DNA constructs as described below:

The first DNA construct encodes a heavy chain or fragment thereof and comprises

- a) a first part which encodes a variable domain comprising alternatively framework and hypervariable regions, said hypervariable regions being in sequence CDR1, CDR2 and CDR3, the amino acid sequences of which are shown in SEQ. ID. No. 1; this first part starting with a codon encoding the first amino acid of the variable domain and ending with a codon encoding the last amino acid of the variable domain, and
- b) a second part encoding a heavy chain constant part or fragment thereof which starts with a codon encoding the first amino acid of the constant part of the heavy chain and ends with a codon encoding the last amino acid of the constant part or fragment thereof, followed by a stop codon.

Preferably, this first part encodes a variable domain having an amino acid sequence substantially identical to the amino acid sequence as shown in SEQ. ID. No. 1 starting with the amino acid at position 1 and ending with the amino acid at position 118. More preferably the first part has the nucleotide sequence as shown in SEQ. ID. No. 1 starting with the nucleotide at position 1 and ending with the nucleotide at position 354. Also preferably, the second part encodes the constant part of a human heavy chain, more preferably the constant part of the human $\gamma 1$ chain. This second part may be a DNA fragment of genomic origin (comprising introns) or a cDNA fragment (without introns).

The second DNA construct encodes a light chain or fragment thereof and comprises

- a) a first part which encodes a variable domain comprising alternatively framework and hypervariable regions; said hypervariable regions being CDR1', CDR2' and CDR3', the amino acid sequences of which are shown in SEQ. ID. No. 2; this first part starting with a codon encoding the first amino acid of the variable domain and ending with a codon encoding the last amino acid of the variable domain, and
- b) a second part encoding a light chain constant part or fragment thereof which starts with a codon encoding the first amino acid of the constant part of the light chain and ends with a codon encoding the last amino acid of the constant part or fragment thereof followed by a stop codon.

Preferably, this first part encodes a variable domain having an amino acid sequence substantially identical to the amino acid sequence as shown in SEQ. ID. No. 2 starting with the amino acid at position 1 and ending with the amino acid at position 107. More preferably, the first part has the nucleotide sequence as shown in SEQ. ID. No. 2 starting with the nucleotide at position 1 and ending with the nucleotide at position 321. Also preferably the second part encodes the constant part of a human light chain, more preferably the constant part of the human κ chain.

The invention also includes CD154 binding molecules in which one or more of the residues of CDR1, CDR2, CDR3, CDR1', CDR2' or CDR3' are changed from the residues shown in SEQ ID No. 1 and SEQ. ID. No. 2; for instance by mutation e.g. site directed mutagenesis of the corresponding DNA sequences. The invention includes the DNA sequences coding for such changed CD154 binding molecules. In particular the invention includes CD154

binding molecules in which one or more residues of CDR1', CDR2' or CDR3' have been changed from the residues shown in SEQ. ID. No. 2.

In the first and second DNA constructs, the first and second parts are preferably separated by an Intron. In the Intron located between the first and second part, an enhancer may be inserted. The presence of this genetic element which is transcribed but not translated, may be required for an efficient transcription of the second part. More preferably the first and second DNA constructs comprise the enhancer of a heavy chain gene advantageously of human origin.

Each of the DNA constructs are placed under the control of suitable control sequences, in particular under the control of a suitable promoter. Any kind of promoter may be used, provided that it is adapted to the host organism in which the DNA constructs will be transferred for expression. However, if expression is to take place in a mammalian cell, a viral promoter may be used, e.g. a cytomegalovirus (CMV), Rous Sarcoma (RSV) or Murine Leukemia (MLV) promoter.

The desired antibody may be produced in a cell culture or in a transgenic animal. A suitable transgenic animal may be obtained according to standard methods which include micro injecting into eggs the first and second DNA constructs placed under suitable control sequences transferring the so prepared eggs into appropriate pseudo-pregnant females and selecting a descendant expressing the desired antibody.

When the antibody chains have to be produced in a cell culture, the DNA constructs must first be inserted into either a single expression vector or into two separate but compatible expression vectors, the former possibility being preferred.

Accordingly, the invention also provides an expression vector able to replicate in a prokaryotic or eukaryotic cell line which comprises at least one of the DNA constructs above described.

Each expression vector containing a DNA construct is then transferred into a suitable host organism. When the DNA constructs are separately inserted in two expression vectors, they may be transferred separately, i.e. one type of vector per cell, or co-transferred, this latter

possibility being preferred. A suitable host organism may be a bacterium, a yeast or a mammalian cell line, this latter being preferred. More preferably, the mammalian cell line is of lymphoid origin, e.g. a myeloma, hybridoma or a normal immortalised B-cell, which conveniently does not express any endogenous antibody heavy or light chain.

It is also preferred that the host organism contains a large number of copies of the CD154 binding molecule coding sequence per cell. If the host organism is a mammalian cell line, this desirable goal may be achieved by amplifying the number of copies of the coding sequences according to standard methods. Such amplification methods often consist of selecting for increased resistance to a drug, said resistance being encoded by the expression vector. Preferred systems for expression of the CD154 binding molecules of the invention include Glutamine Synthetase-based systems (GS-based), such as those described in EP 0256055 B, EP 0323987 B and European patent application 89303984.4.

In a further aspect of the invention there is provided a process for the production of a CD154 binding molecule which comprises (i) culturing an organism which is transformed with an expression vector as defined above and (ii) recovering the CD154 binding molecule from the culture.

In accordance with the present invention it has been found that the human anti-human ABI793 antibody has a desirable antigen epitope specificity. Thus it has been found that ABI793 recognizes an epitope on both the human as well as the cynomolgus monkey CD154 antigen; this epitope is different from the respective epitope(s) which are recognized by the mouse anti-human CD154 Mabs 5c8 and 24-31. Particularly, while the mouse anti-human Mab 5c8 only recognizes an epitope formed on the trimeric human CD154, the human anti-human ABI793 antibody binds to an epitope present on both the monomeric and trimeric human CD154.

Antibodies, in particular chimeric and CDR-grafted antibodies and especially human antibodies, which have binding specificity for an epitope of human CD154 different from the respective epitope(s) which are recognized by the mouse anti-human CD154 Mabs 5c8 and 24-31 and use of such antibodies e.g. in the prevention of organ graft rejection or in the prevention or treatment of autoimmune disorders or diseases, atherosclerosis or Alzheimer disease, are novel and are included within the scope of the present invention.

Antibodies in accordance with the present invention (hereinafter referred to as Antibody of the invention) exhibit valuable pharmacological properties, e.g. they interfere with or modulate the physiological CD154/CD40 interactions, e.g. as demonstrated in standard in vitro and in vivo test methods, for example as described below:

1. Inhibition of CD154:CD40 Binding

The ability to inhibit the binding of CD154 to CD40 is tested in a cell-free competitive binding assay. Recombinant soluble human CD154 (i.e., the extracellular portion of human CD154 fused to mouse C_κ) is immobilized on microtiter plates and the plates incubated, in the presence or absence of a putative inhibitor, with biotinylated recombinant soluble human CD40. The fraction of CD40 bound to CD154 is fluorimetrically determined using Eu-labelled streptavidin as the detection reagent. In this assay, the Antibody of the invention has an inhibitory capacity expressed as IC₅₀, i.e. the concentration needed to achieve 50% inhibition of the binding, within 5 to 150 ng/ml. ABI793 has been found to have an IC₅₀ of 75±11 ng/ml.

The inhibition of the CD154:CD40 binding by the Antibody of the invention, e.g. ABI793, is specific since they do not inhibit TNF:TNF-RI binding when tested at concentrations which are up to more than 50-fold higher than the IC₅₀ found for the CD154:CD40 binding (CD154 and CD40 are members of the TNF and TNF receptor (TNF-R) family, i.e. they share homology with TNF and TNF-R, respectively). The inhibition of the TNF:TNF-RI binding is performed by means of a competitive binding assay set up in the same format as the CD154:CD40 binding assay.

2. Inhibition of CD154/IL-4 driven B Cell Proliferation

Soluble recombinant mouse or human CD154 protein, in combination with IL-4, stimulates purified human B cells which constitutively express surface CD40, to proliferate and to produce immunoglobulin. Briefly, cultures are set up in 96-well flat-bottomed tissue culture clusters (Costar) in RPMI (Gibco) supplemented with Na-pyruvate (1mM; Gibco), MEM nonessential amino acids (Gibco), 2-mercaptoethanol (50 µM), L-glutamine (2mM), gentamycin (50µg/ml; Gibco), bacto asparagine (20µg/ml; Difco), human insulin (5µg/ml; Sigma), human transferrin (40 µg/ml; Sigma), and selected fetal calf serum (10%, Hyclone Labs, UT). In standard assays, purified B cells (2.5x10⁵/ml; 0.2 ml cultures) are stimulated for 5 days in triplicates by recombinant human CD154 (3 µg/ml) and IL-4 (100U/ml). To

assess B cell proliferation, cells are pulsed on day 4 with 1mCi/well of ^3H -TdR, and the uptake of radioactivity is determined 16h later. SD between triplicate cultures are <20%. Control cultures are stimulated with murine CD154. In this assay, the Antibody of the Invention inhibits the CD154-dependent B cell proliferation: ABI793 has been found to have an IC_{50} of 73 ± 21 ng/ml.

3. Induction of B cell proliferation by *Staphylococcus aureus* Cowan I strain (SAC)

SAC activates approximately 20% of human peripheral B cells by crosslinking surface immunoglobulin. Purified B cells ($2.5 \times 10^5/\text{ml}$; 0.2 ml cultures) are stimulated in triplicates for 10 days by soluble SAC (Sigma; dilution 1:10,000) and IL-2 (Chiron; 300U/ml). To assess B cell proliferation, cells are pulsed on day 4 with 1mCi/well of ^3H -TdR, and the uptake of radioactivity is determined 16h later. SD between triplicate cultures are <20%.

B cell proliferation triggered with SAC in combination with IL-2, i.e. CD154 independent B cell proliferation, is not inhibited by the Antibody of the Invention, e.g. ABI793, at a concentration about 40-fold higher than the IC_{50} .

4. Renal Allografts

Transplantation is done between genetically distinct donor-recipient pairs of cynomolgus monkeys as determined by MHC analysis. The allograft is implanted using standard microvascular techniques to create an end-to-side anastomosis between the donor renal artery and recipient distal aorta as well as between the donor renal vein and recipient vena cava. a primary ureteroneocystostomy is then created. Bilateral native nephrectomy is completed before closure. The Antibody, e.g. ABI793, is administered intravenously, at a dose of 20mg/kg prior to transplantation and after the transplantation is complete and then at the same dose on postoperative days 3, 10, 18 and 28, followed by a single dose every 28 days for 5 months. The thus treated monkeys have been found to show the desired effect.

The Antibody of the Invention is therefore useful in the treatment and/or prevention of diseases or disorders wherein CD154 modulation and/or interference with or inhibition of the CD154:CD40 interactions is therapeutically beneficial, prevention of macrophage-associated inflammatory processes or in the treatment of diseases wherein suppression of antibody responses to antigens are desirable, e.g. inhibition of B cell proliferation and

differentiation, inhibition of T cell responses, induction or modulation of T cell tolerance or inhibition of the growth of tumor cells expressing CD154 antigen. Such conditions include autoimmune and non-autoimmune disorders. Specific conditions which are potentially treatable by administration of the Antibody of the Invention include e.g. Allergic bronchopulmonary aspergillosis; Autoimmune hemolytic anemia; Acanthosis nigricans; Allergic contact dermatitis; Addison's disease; Atopic dermatitis; Alopecia areata; Alopecia universalis; Amyloidosis; Anaphylactoid purpura; Anaphylactoid reaction; Aplastic anemia; Angioedema, hereditary or idiopathic; Ankylosing spondylitis; Arteritis, cranial, giant cell or temporal; Arteritis, Takayasu's; Asthma; Ataxia-telangiectasia; Autoimmune oophoritis; Autoimmune orchitis; Autoimmune polyendocrine failure; Behcet's disease; Berger's disease; Buerger's disease; Bullous pemphigus; Candidiasis, chronic mucocutaneous; Caplan's syndrome; Post-myocardial infarction syndrome; Post-pericardiotomy syndrome; Carditis; Celiac sprue; Chagas's disease; Chedlak-Higashi syndrome; Churg-Strauss disease; Cogan's syndrome; Cold agglutinin disease; CREST syndrome; Crohn's disease; Cryoglobulinemia; Cryptogenic fibrosing alveolitis; Dermatitis herpetiformis; Dermatomyositis; Diabetes mellitus; Diamond-Blackfan syndrome; DiGeorge syndrome; Discoid lupus erythematosus; Eosinophilic fasciitis; Episcleritis; Erythema elevatum diutinum; Erythema marginatum, multiforme or nodosum; Familial Mediterranean fever; Felty's syndrome; Fibrosis pulmonary, Glomerulonephritis, anaphylactoid, autoimmune, post-streptococcal, or post-transplantation; Glomerulopathy, membranous; Goodpasture's syndrome; Graft-vs.-host disease; Granulocytopenia, immune-mediated; Granuloma annulare; Granulomatosis, allergic; Granulomatous myositis; Grave's disease; Hashimoto's thyroiditis; Hemolytic disease of the newborn; Hemochromatosis, Idiopathic; Henoch-Schoenlein purpura; Hepatitis, chronic active and chronic progressive; Histiocytosis X; Hypereosinophilic syndrome; Idiopathic thrombocytopenic purpura; Job's syndrome; Juvenile dermatomyositis; Juvenile rheumatoid arthritis (Juvenile chronic arthritis); Kawasaki's disease; Keratitis; Keratoconjunctivitis sicca; Landry-Guillain-Barre-Strohl syndrome; Leprosy, lepromatous; Loeffler's syndrome; Lyell's syndrome; Lyme disease; Lymphomatoid granulomatosis; Mastocytosis, systemic; Mixed connective tissue disease; Mononeuritis multiplex; Muckle-Wells syndrome; Mucocutaneous lymph node syndrome; Multicentric reticulohistiocytosis; Multiple sclerosis; Myasthenia gravis; Mycosis fungoides; Necrotizing vasculitis, systemic; Nephrotic syndrome; Overlap syndrome; Panniculitis; Paroxysmal cold hemoglobinuria; Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; Pemphigoid; Pemphigus; Pemphigus erythematosus, foliaceus or vulgaris; Pigeon breeder's disease; Pneumonitis,

hypersensitivity; Polyarteritis nodosa; Polymyalgia rheumatica; Polymyositis; Polyneuritis, idiopathic; Portuguese familial polyneuropathies; Pre-eclampsia/eclampsia; Primary biliary cirrhosis; Progressive systemic sclerosis (Scleroderma); Psoriasis; Psoriatic arthritis; Pulmonary alveolar proteinosis or fibrosis, Raynaud's phenomenon/syndrome; Reidel's thyroiditis; Reiter's syndrome, Relapsing polychondritis; Rheumatic fever; Rheumatoid arthritis; Sarcoidosis; Scleritis; Sclerosing cholangitis; Serum sickness; Sezary syndrome; Sjogren's syndrome; Stevens-Johnson syndrome; Still's disease; Subacute sclerosing panencephalitis; Sympathetic ophthalmia; Systemic lupus erythematosus; Transplant rejection; Ulcerative colitis; Undifferentiated connective tissue disease; Urticaria, chronic or cold; Uveitis; Vitiligo; Weber-Christian disease; Wegener's granulomatosis; Wiskott-Aldrich syndrome; as well as atherosclerosis, Alzheimer disease, leukemia, HIV or lymphoma. By transplant rejection is meant rejection of an allo- or xenograft, e.g. cells, tissues or solid organs, for example pancreatic islets, bone marrow, corneal tissue, neuronal tissue, heart, lung, combined heart-lung, kidney, liver, bowel, pancreas, trachea, oesophagus.

For the above uses the required dosage will of course vary depending on the mode of administration, the particular condition to be treated and the effect desired. In general, satisfactory results are indicated to be obtained at dosages of from about 0.05 to 100 mg /kg body weight. The Antibodies of the Invention may be administered by any conventional route, in particular enterally, e.g. orally, e.g. in the form of capsules, or parenterally, e.g. in the form of an injectable solution or suspension, topically or by inhalation (intranasal or oral inhalation).

Pharmaceutical compositions comprising an Antibody of the Invention in association with at least one pharmaceutically acceptable carrier or diluent may be manufactured in conventional manner by mixing with a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

In accordance with the foregoing the present Invention further provides:

1. A method for preventing or treating disorders, diseases or conditions such as indicated above, e.g. inhibition of B cell proliferation and differentiation or T cell responses, induction or modulation of T cell tolerance or prevention of macrophage-associated inflammatory processes, in a subject in need of such treatment, which method comprises administering to said subject an effective, non-toxic amount of a (human) antibody to CD154 as disclosed herein, e.g. ABI793;

2. Use of a (human) antibody to CD154 as disclosed herein, e.g. ABI793, in a method such as indicated above;
3. A pharmaceutical composition, e.g. for use in a method such as indicated above, comprising a (human) antibody to CD154 as disclosed herein, e.g. ABI 793, in association with a pharmaceutically acceptable diluent or carrier therefor.;
4. A (human) antibody to CD154 as disclosed herein, e.g. ABI793, for use in the preparation of a pharmaceutical composition as in 3.

The Antibody of the Invention may be administered as the sole active Ingredient or in conjunction with, e.g. as an adjuvant to, other drugs in immunomodulating regimens or other anti-inflammatory agents, e.g. for the treatment or prevention of allo- or xenograft acute or chronic rejection or inflammatory or autoimmune disorders. For example, Antibody of the Invention may be used in combination with cyclosporins, rapamycins or ascomycins, or their immunosuppressive analogs or derivatives, e.g. cyclosporin A, cyclosporin G, FK-506, ABT-281, ASM981, rapamycin, 40-O-(2-hydroxy)ethyl-rapamycin etc.; corticosteroids; cyclophosphamide; azathioprene; methotrexate; FTY720; leflunomide; mizoribine; mycophenolic acid; mycophenolate mofetil; 15-deoxyspergualine; Immunosuppressive monoclonal antibodies, e.g., monoclonal antibodies to CD40 or to other leukocyte receptors, e.g., MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD25, CD28, CD80, CD86, CD45 or CD58 or their ligands; other Immunomodulatory compounds, e.g. CTLA4lg; or adhesion molecule inhibitors, e.g. LFA-1 antagonists, ICAM-1 or -3 antagonists, VCAM-4 antagonists or VLA-4 antagonists.

Where the Antibody of the Invention is administered in conjunction with other immunosuppressive / immunomodulatory or anti-inflammatory therapy, dosages of the co-administered immunosuppressant, immunomodulatory or anti-inflammatory compound will of course vary depending on the type of co-drug employed, e.g. whether it is a steroid or a cyclosporin, on the specific drug employed, on the condition being treated and so forth. In accordance with the foregoing the present invention provides in a yet further aspect:

5. A method as defined above comprising co-administration, e.g. concomitantly or in sequence, of a therapeutically effective non-toxic amount of a (human) antibody to CD154 as disclosed herein, e.g. ABI793, and a second drug substance, said second

drug substance being an immunosuppressant, immunomodulatory or anti-inflammatory drug, e.g. as indicated above.

6. A therapeutic combination, e.g. a kit, for use in any method as defined under 1 above, comprising a (human) antibody to CD154 as disclosed herein, e.g. ABI793, in free form or in pharmaceutically acceptable salt form, with at least one pharmaceutical composition comprising an immunosuppressant, immunomodulatory or anti-inflammatory drug. The kit may comprise instructions for its administration.

Preferably the Antibody of the Invention is a CD154 binding molecule according to the first and second aspects of the invention. Advantageously the Antibody of the Invention is a human antibody, most preferably the ABI793 antibody or a direct equivalent thereof.

The Invention is further described by way of illustration only in the following Examples.

Transgenic mice engineered to express the human IgG/k repertoire instead of the murine immunoglobulin repertoire (Fishwild et al., 1996, Nat Biotechnol., 14, 845-851) are used to generate antibodies to human CD154. Mice are repeatedly immunized with a soluble human CD154 recombinant protein consisting of the extracellular domain of human CD154 fused to the mouse C κ chain (CD154- κ). To make the protein more immunogenic, the soluble CD154 is crosslinked with KLH. Priming with CD154:KLH is followed by repeated immunizations with cells of a recombinant human cell line which constitutively expresses surface CD154. Spleen cells from these mice are immortalized by standard hybridoma technology and murine hybridoma cells are obtained which secrete human anti-CD154 antibodies of the IgG1/ κ type. These antibodies are finally selected by their reactivity to human CD154 and by their ability to inhibit the binding of CD154 to CD40 as measured in a competitive ELISA type assay.

Example 1: Generation of the hybridoma and purification of the antibody

Genetically engineered mouse 66 (Medarex Inc. Annadale, NJ) is immunized with a soluble human CD154 recombinant protein as described above (50 μ g) s.c. in several sites in adjuvant. The mouse is boosted five additional times with the last injection three days before the fusion. On the day of the fusion mouse 66 is killed by CO₂ inhalation and spleen

cells (4.1×10^7) are fused by a routine method using PEG 4000 with an equal number of PAI-O cells, a mouse myeloma cell line. Fused cells are plated out in 624 wells (1ml/well) containing a feeder layer of mouse peritoneal cells (Balb C mice), in HAT supplemented RPMI 1640, 10% heat inactivated fetal calf serum 5×10^{-6} M β -mercaptoethanol. Supernatants are collected and tested in ELISA and screened for CD154 reactive monoclonal antibodies. Five monoclonal antibodies of the IgG/k subclass are identified. Cloning is done using 4 x 96 well microtiter plates, plating 0.5 cells per well. After two weeks wells are inspected with an inverted microscope. Supernatant is collected from wells positive for growth and production of anti-CD154 monoclonal antibodies is evaluated by ELISA. Positive hybridomas are sub-cloned and the produced antibody is isolated by affinity from 1-2L supernatant. Hybridoma # 207.2 is selected yielding the Antibody ABI793 and the produced Antibody is purified by affinity chromatography on a protein A column.

Antibody ABI793 is characterized by the following amino acid and DNA sequences as given in SEQ. ID no. 1 (heavy chain) and SEQ ID No. 2 (light chain).

SEQ. ID no. 1

1	10	20	30	40	50
QVQLVQSGAEVQKPGSEVKVSCKASGOTT <u>NEAFN</u> WVRQVPGQGLEWMG <u>RIIPSLDIAS</u>					
			CDR1		CDR2
60	70	80	90	100	110 118
YAQKIQDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAMYYCAR <u>EYDGGQY</u> DYWGQGTIVTVSS					
				CDR3	

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	

- 19 -

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
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>RASQGISWLA</u> WYQQKPEKAPKSLIY <u>AASSLOH</u>					
			CDR1'	CDR2'	
60	70	80	90	100	107
GVPERFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC <u>QQYNSTYPT</u> FGGGTKVEIK					
			CDR3'		

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
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATTTTG 250

251
CAACTTATTA CTGCCAACAG TATAATAGTT ACCCGTTCAC TTTCGGCGGA 300

301
GGGACCAAGG TGGAGATCAA A 321

Example 2: Determination of dissociation equilibrium constant

The association and dissociation rate constant for the binding of recombinant human CD154 to ABI793 is determined by BIAcore analysis. ABI793 is immobilized, and binding of soluble recombinant CD154 (CD154-κ) in a concentration range from 10 to 160 nM is measured by surface plasmon resonance. The chosen format represents a monovalent interaction. Data analysis is performed using the BIAevaluation software.

Association rate constant	[M ⁻¹ xs ⁻¹] (n=3)	(2.34 ± 0.13) x 10 ⁴
Dissociation rate constant	[s ⁻¹] (n=3)	(5.38 ± 0.43) x 10 ⁻⁴
Dissociation equilibrium constant K _D	[nM] (n=3)	23.1 ± 2.8

Example 3: Epitope Analysis

Cross-blocking experiments are performed in the presence of the mouse anti-CD154 MAbs 5c8 and 24-31: surface CD154-expressing T cells are stained with one of the three, for this purpose FTC-labelled, anti-CD154 MAbs. Preincubation of Jurkat D1.1 cells (which constitutively express CD154) with unlabelled 24-31 prior to staining with FTC-5c8 abolishes the fluorescent signal, i.e. blocks the binding of FTC-5c8 in the same way as does pre-incubation with unlabelled 5c8 (Figure 1A vs 1B). This indicates that 5c8 and 24-31 recognize a mutual or juxtaposed epitope(s) on the CD154 antigen. In contrast, pre-incubation with unlabelled ABI793 does not affect binding of FTC-labelled 5c8 (Figure 1D). This demonstrates that ABI793 recognizes an epitope on the CD154 antigen which is different from the epitope(s) recognized by the mouse anti-human CD154 MAbs 5c8 and 24-31. These results are confirmed using PMA/ionomycin-activated, isolated CD154-positive T cells of either human (Figure 2) or cynomolgus monkey (Figure 3) origin. In these binding assays, using the same procedure as disclosed for the Jurkat cells, ABI793 recognizes an epitope on both the human as well as the cynomolgus monkey CD154

antigen which is different from the respective epitope(s) recognized by the mouse anti-human CD154 Mabs 5c8 and 24-31.

CD154 is expressed on T cells as a noncovalent homotrimer; likewise, the biologically active soluble CD154 forms spontaneously a noncovalent homotrimer in solution. To analyse whether the epitope recognized by ABI793 is dependent on the intact trimeric structure of CD154, slot blot (Figure 4) and Western blot (Figure 5) analyses is performed. Figure 3 shows that trimeric CD154 (i.e., biologically active, soluble recombinant CD154) spotted onto a nitrocellulose membrane is recognized by ABI793 as well as by 5c8 and 24-31. This is in contrast to the results of the Western blot analyses. Under the conditions of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) CD154 migrates as a monomer. After blotting to a nitrocellulose membrane only ABI793 is able to reveal the ca. 40kD CD154 fusion protein (Figure 5, "ABI793", lane 1, arrow "A") as well as the 15kD bacterially expressed extracellular domain of CD154 (Figure 5, "ABI793", lane 2, arrow "B"; the ca. 30kD protein floating up in this lane could potentially be a CD154 dimer). In contrast, 5c8 and 24-31 are unable to reveal either CD154 recombinant protein although these antibodies bind to recombinant CD154 spotted directly onto a nitrocellulose membrane (Figure 4), i.e., to the trimeric form. This indicates that ABI793 recognizes both the CD154 monomer and trimer while 5c8 and 24-31 bind solely to the trimer. This corroborates the findings of the FACS studies which demonstrate that ABI793 recognizes an epitope on the CD154 antigen which is different from the one(s) recognized by 5c8 and 24-31.

CLAIMS

1. A CD154 binding molecule which comprises an antigen binding site comprising at least one immunoglobulin heavy chain variable domain (HV) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1, CDR2 and CDR3, said CDR1 having the amino acid sequence Asn-Phe-Ala-Phe-Asn, said CDR2 having the amino acid sequence Arg-Ile-Leu-Pro-Ser-Leu-Asp-Ile-Ala-Ser, and said CDR3 having the amino acid sequence Glu-Val-Asp-Gly-Gly-Gly-Phe; and direct equivalents thereof.

2. A CD154 binding molecule comprising both heavy (HV) and light chain (LV) variable domains in which said CD154 binding molecule comprises at least one antigen binding site comprising:

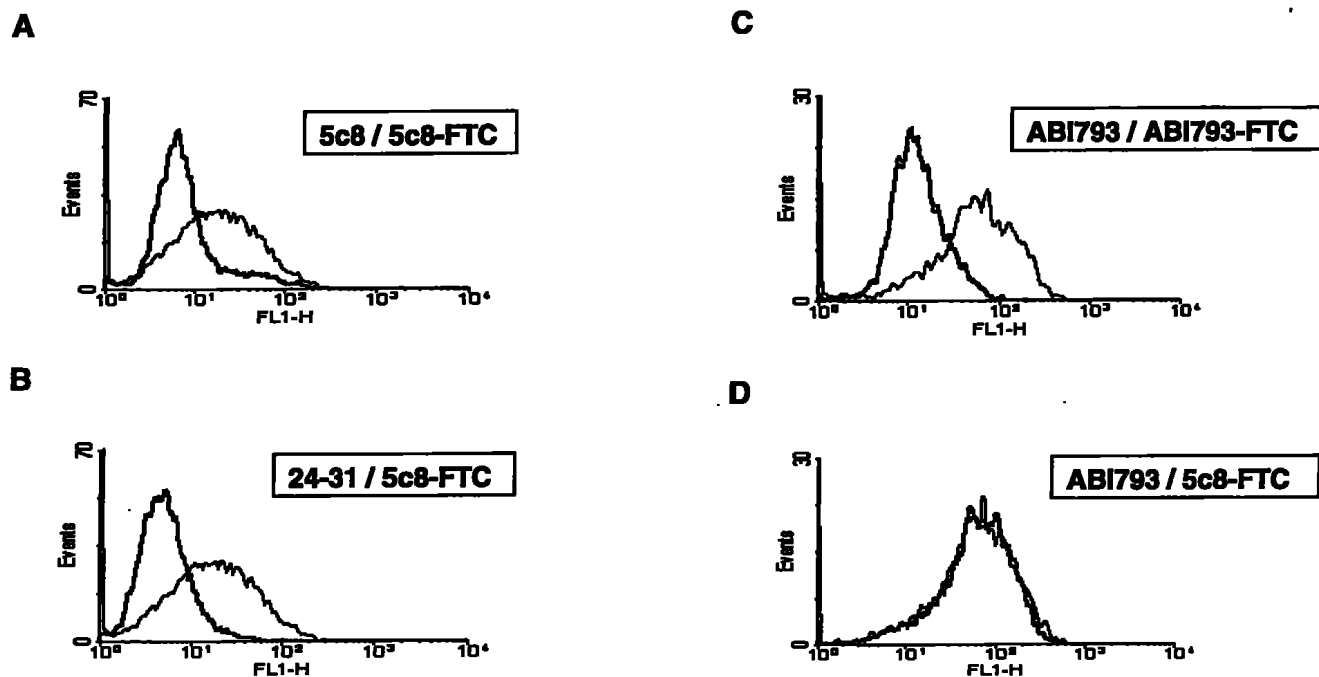
- a) an immunoglobulin heavy chain variable domain (HV) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1, CDR2 and CDR3, said CDR1 having the amino acid sequence Asn-Phe-Ala-Phe-Asn, said CDR2 having the amino acid sequence Arg-Ile-Leu-Pro-Ser-Leu-Asp-Ile-Ala-Ser, and said CDR3 having the amino acid sequence Glu-Val-Asp-Gly-Gly-Gly-Phe, and
- b) an immunoglobulin light chain variable domain (LV) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1', CDR2' and CDR3', said CDR1' having the amino acid sequence Arg-Ala-Ser-Gln-Gly-Ile-Ser-Ser-Trp-Leu-Ala, said CDR2' having the amino acid sequence Ala-Ala-Ser-Ser-Leu-Gln-Ser, and said CDR3' having the amino acid sequence Gln-Gln-Tyr-Asn-Ser-Tyr-Pro-Phe-Tyr;

and direct equivalents thereof

e.g. human antibodies to CD154, e.g. the variable domains of both heavy and light chains are of human origin, e.g. as shown in SEQ. ID. No 1 and SEQ. ID. No.2, e.g. ABI793,

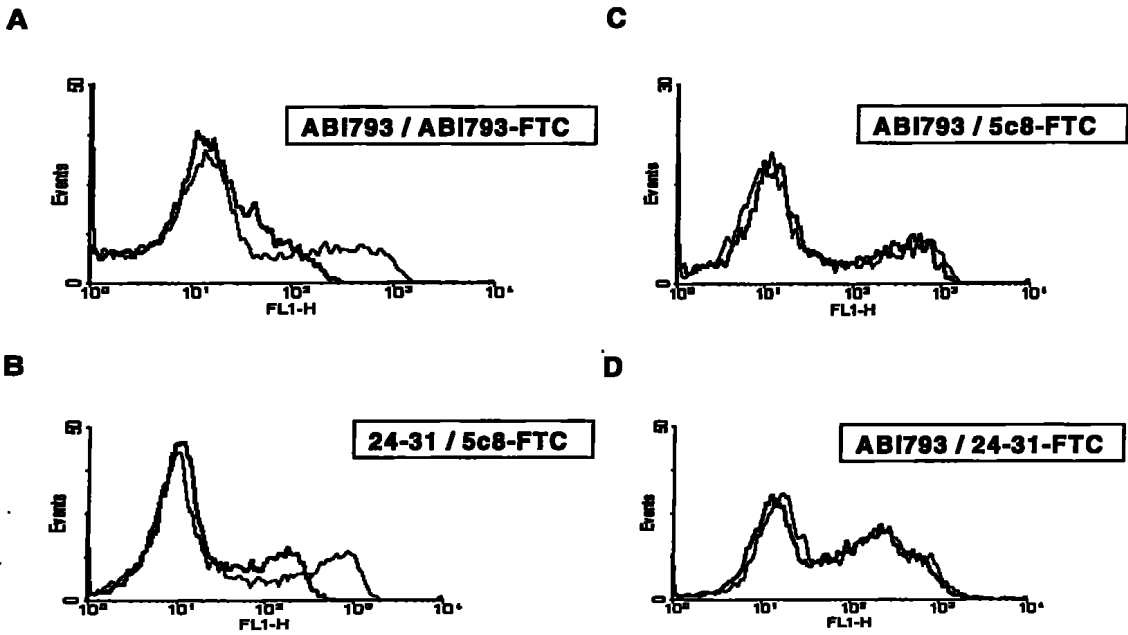
a process for its production, its use as a pharmaceutical, a pharmaceutical composition comprising such a CD154 binding molecule and a method of treatment using such a CD154 binding molecule, substantially as hereinbefore defined and described.

Figure 1: Epitope analysis: cross-blocking experiments using Jurkat D1.1 cells



Staining with FTC-labeled mAbs as indicated, alone (regular line) or after prior pre-incubation with the indicated unlabeled anti-CD154 mAb (bold line).

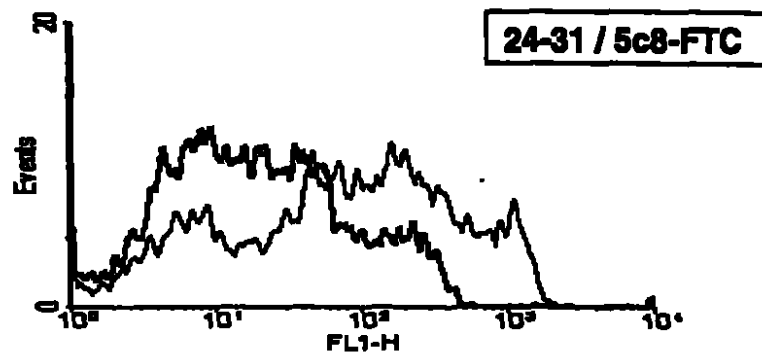
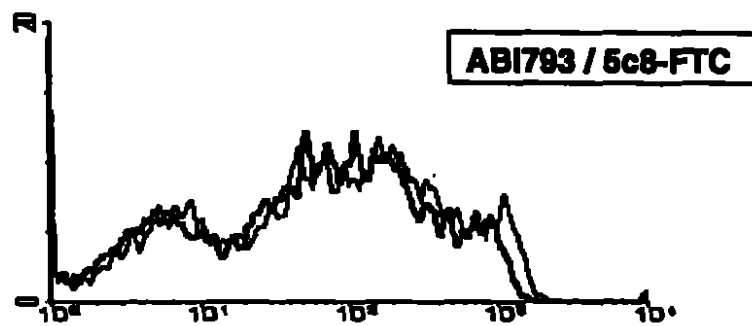
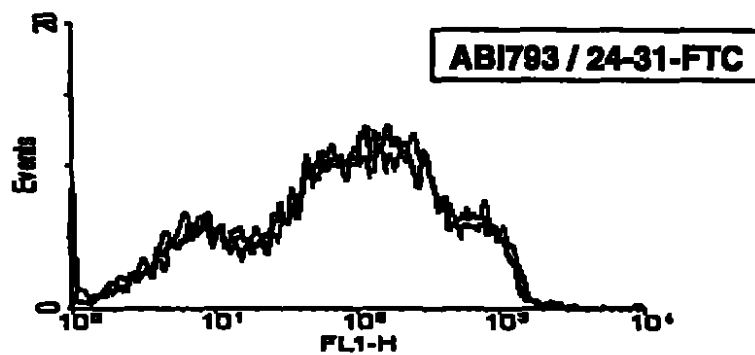
Figure 2: Epitope analysis: cross-blocking experiments using activated human T cells



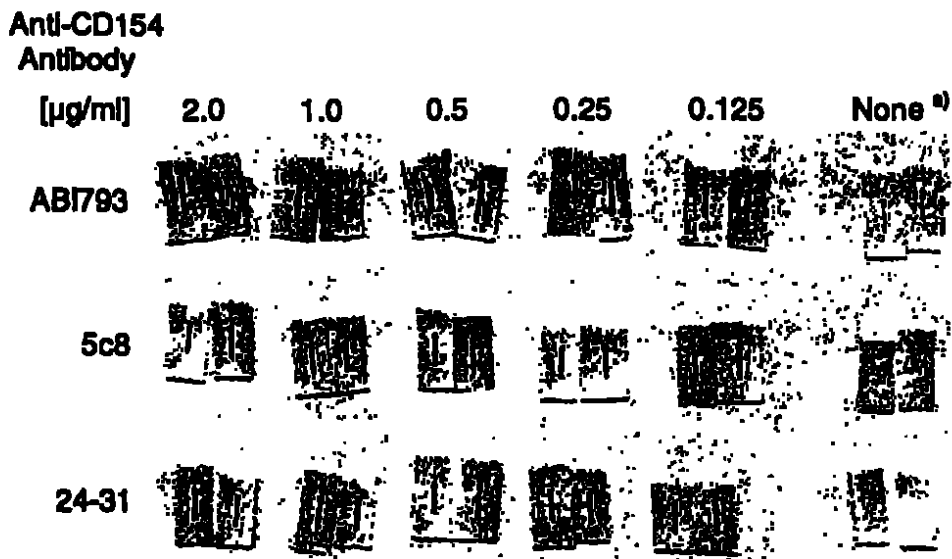
As Figure 1, but using purified CD4-positive human T cells which were activated for 6 hours with PMA/ionomycin prior to staining.

82

Figure 3:- Epitope analysis: cross-blocking experiments using activated cynomolgus monkey T cells

A**B****C**

As Figure 1, but using purified CD4-positive cynomolgus monkey T cells which were activated for 4 hours with PMA/ionomycin prior to staining.

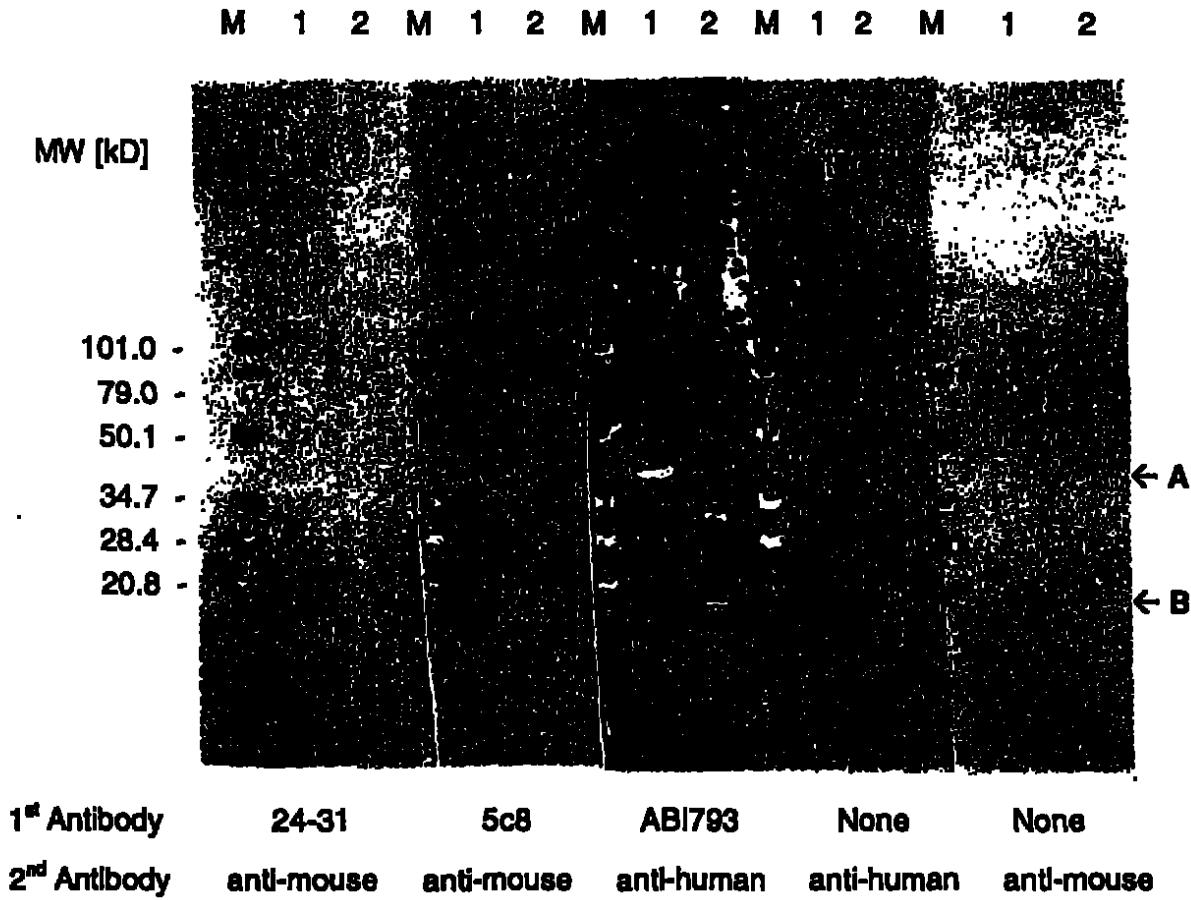
Figure 4: Detection of trimeric recombinant human CD154

1 μ g of recombinant soluble human CD154 (*i.e.*, the extracellular portion of human CD154 fused to mouse-C₂) is slot-blotted onto a nitrocellulose filter. After blocking the membrane with 5% BSA, individual strips are incubated for 1h with various concentrations of the anti-human CD154 antibodies (as indicated). Bound antibody is then revealed by a 45-minute incubation with either alkaline phosphatase-coupled γ -chain-specific goat-anti-human IgG (for AB1793) or goat-anti-mouse IgG (for 5c8 and 24-31) followed by a standard reaction with BCIP/NBT.

^{a)} To control for cross-reaction with the mouse-C₂ part of the the recombinant CD154, strips are incubated with the respective second antibody only.

84

Figure 5: Detection of monomeric recombinant human CD154



Five identical sample series of recombinant human CD154, either in form of a fusion protein consisting of the extracellular part of CD154 fused to mouse C_κ or the extracellular portion only, expressed in *E. coli*, are electrophoresed on one 4-20% PAGE gradient gel. After blotting onto nitrocellulose the membrane is cut and the individual strips sequentially incubated for 1 hour each with the anti-human CD154 antibodies as indicated. Bound antibody is then revealed by a 45-minute incubation with an alkaline phosphatase-coupled γ-chain-specific second antibody (goat-anti-mouse IgG and goat-anti-human IgG, respectively), followed by a standard reaction with BCIP/NBT.

Lane M: pre-stained marker; Lane 1: human-CD154: mouse-C_κ fusion protein; Lane 2: bacterially-expressed extracellular part of human CD154

(Emblema)

(Logotipo)

INVERSIONISTA EN LA GENTE

LA OFICINA DE PATENTES

La Oficina de Patentes

Concept House

Cardiff Road

Newport

Gales del Sur

NP10 8QQ

Yo, el suscrito, siendo un funcionario debidamente autorizado de acuerdo con la Sección 74(1) y (4) de la Ley de Desregulación y Contratación Externa de 1994, para firmar y expedir certificados a nombre del Contralor General, mediante la presente certifico que el anexo es una copia fiel de los documentos tal como se presentaron originalmente en relación con la Solicitud de Patente identificada en los mismos.

De acuerdo con las Reglas de Patentes (Re-registro de Sociedades) de 1982, si una sociedad nombrada en este certificado y en cualesquiera documentos acompañantes, se ha re-registrado, de acuerdo con la Ley de Sociedades de 1980, con el mismo nombre que aquél con el que se registró inmediatamente antes del re-registro, salvo por la sustitución como, o la

88
86

inclusión como, la última parte del nombre con las palabras "sociedad pública limitada" o sus equivalentes en Galo, las referencias al nombre de la sociedad en este certificado y en cualesquiera documentos acompañantes, se tratarán como referencias al nombre con el cual así se re-registró.

De acuerdo con las reglas, las palabras "sociedad pública limitada" pueden ser reemplazadas por s.p.l., spl, S.P.L., ó SPL.

El re-registro según la Ley de Sociedades no constituye una nueva entidad legal, sino que meramente sujeta a la sociedad a ciertas reglas adicionales de la ley de sociedades.

Firma: (Firmado)

Fecha: 7 de febrero de 2001.

Una Agencia Ejecutiva del Departamento
de Comercio e Industria

(Aparece un sello móvil de la Oficina de Patentes).

87

1/77

7MAR00 E522085-3 D00524

P01/7700 0.00 - 0006398.2

Ley de Patentes de 1977

(Regla 16)

(Aparece dos sellos ovalados impresos con la siguiente leyenda:

LA OFICINA DE PATENTES

16 DE MARZO DE 2000

RECIBIDO PERSONALMENTE).

LA OFICINA DE PATENTES

La Oficina de Patentes

Cardiff Road

Newport

Gwent NP9 1RH

SOLICITUD PARA LA CONCESION DE UNA PATENTE

(Ver las notas al reverso de esta forma. También puede obtener un folleto de explicaciones en la Oficina de Patentes, para ayudarle a llenar esta forma).

1. Su referencia: 4-31266P1
2. Número de Solicitud de Patente:

(La Oficina de Patentes llenará esta parte)

0002386.1

16 MAR 2000

3. Nombre completo, domicilio, y código postal de cada solicitante (*subraye todos los apellidos*):

NOVARTIS AG

SCHWARZWALDALLEE 215

4058 BASILEA

SUIZA

Número ADP de Patentes (*si lo conoce*):

7125487002

Si el solicitante es un cuerpo corporativo, dé el país/estado de su incorporación:

SUIZA

4. Título de la invención:

COMPUESTOS ORGANICOS

5. Nombre de su agente (*si tiene alguno*):

B. A. YORKE & CO.

AGENTES DE PATENTES AUTORIZADOS

"Dirección para notificaciones" en el Reino Unido, a donde se debe enviar toda la correspondencia (*incluyendo el código postal*):

COOMB HOUSE, 7 ST. JOHN'S ROAD
ISLEWORTH
MIDDLESEX TW7 6NH

Número ADP de Patentes (si lo conoce):

1800001

6. Si está declarando prioridad a partir de una o más solicitudes de patente anteriores, dé el país y la fecha de presentación de cada una de estas solicitudes anteriores, y (si lo conoce) cada número de solicitud:

País: - - -

Número de solicitud de prioridad (si lo sabe): - - -

Fecha de presentación (día/mes/año): - - -

7. Si esta solicitud está dividida o se deriva de otra manera de una solicitud anterior del Reino Unido, dé el número y la fecha de presentación de la solicitud anterior:

Número de solicitud anterior: - - -

Fecha de presentación (día/mes/año): - - -

8. ¿Es una declaración de invención y del derecho de otorgar una patente requerida en apoyo de esta solicitud? (Conteste "Sí" en el caso de que:

9290

- a) cualquier solicitante nombrado en la parte 3 no sea un inventor, ó
- b) haya un inventor que no esté nombrado como un solicitante, ó
- c) cualquier solicitante nombrado sea un cuerpo corporativo.

Ver la nota (d)): **Sí**

9. Anote el número de páginas para cualquiera de los siguientes artículos que esté presentando con esta forma. No cuente las copias del mismo documento.

Páginas de continuación de esta forma	--
Descripción	21
Reivindicaciones	1
Resumen	--
Dibujo(s)	5

10. Si también está presentando cualquiera de los siguientes, informe cuántas en cada uno de los puntos.

Documentos de prioridad:	--
Traducción de documentos de prioridad:	--
Declaración de invención y derecho a la concesión de una patente (Forma de Patentes 7/77):	--
Solicitud de examen preliminar y búsqueda (Forma de Patentes 9/77):	Una

Solicitud de examen sustantivo (*Forma de Patentes 10/77*):

Cualesquiera otros documentos (por favor especifique):

11. Solicitamos la concesión de una patente con base en esta solicitud.

Firma: B. A. Yorke & Co.

(Firmado)

Fecha: 16.03.00

12. Nombre y número telefónico diurno de la persona para hacer contacto en el Reino Unido:

SRA. E. CHEETHAM

020 8560 5847

Advertencia

Después de que se haya presentado una solicitud de patente, el Contralor de la Oficina de Patentes considerará si se debe prohibir o restringir la publicación o comunicación de la invención, de acuerdo con la Sección 22 de la Ley de Patentes de 1977. Se le informará si es necesario prohibir o restringir su invención de esta manera. Además, si usted vive en el Reino Unido, la Sección 23 de la Ley de Patentes de 1977 le impide solicitar una patente en el extranjero sin obtener primero un permiso por escrito de la Oficina de Patentes, a menos que se

92

haya presentado una solicitud cuando menos 6 semanas antes en el Reino Unido para una patente para la misma invención, y no se hayan dado instrucciones que prohíban la publicación o la comunicación, o se hayan revocado dichas instrucciones.

Notas

- a) Si necesita ayuda para llenar esta forma, o tiene alguna pregunta, por favor haga contacto con la Oficina de Patentes al 0645 500505.
 - b) Escriba sus respuestas en letras mayúsculas, utilizando tinta negra, o puede mecanografiarlas.
 - c) Si no hay suficiente espacio para todos los detalles pertinentes en cualquier parte de esta forma, por favor continúe en una hoja de papel separada, y escriba "ver página de continuación" en las partes pertinentes. Cualquier página de continuación se debe adjuntar a esta forma.
 - d) Una vez que haya llenado la forma, debe recordar firmarla y fecharla.
 - e) Para los detalles de los derechos y de las maneras de pagar, por favor haga contacto con la Oficina de Patentes.
-

Compuestos Orgánicos

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 en el tratamiento y/o prevención de enfermedades o desórdenes en donde la modulación de CD154, 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/CD40 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 anti-

94

cuerpos 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 bloquear la interacción de CD154/CD40, por ejemplo, con el fin de prevenir o tratar los desórdenes y enfermedades como se indica, 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 aminoácidos 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 ca-

92
95

dena 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 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-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.

A menos que se indique de otra manera, cualquier cadena de polipéptido se describe en la presente teniendo una secuencia

Caso 4-31266P1

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 hibridomas, y anticuerpos quiméricos, injertados con CDR o humanos, o cualquier fragmento de los mismos, por ejemplo fragmentos $F(ab')_2$ y Fab, así como anticuerpos de una sola cadena o de un solo dominio.

45
97

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 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 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 diferente, 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 anticuerpo aceptor, 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 an-

Caso 4-31266P1

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 humanos 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:2. 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 interest", 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 cual-

Caso 4-31266P1

quier 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 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:2 muestra la estructura de cadena ligera de ABI793 preferida, la cual consiste, en secuencia, en las regiones FR1', FR2', FR3', y FR4'.

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:1, empezando con el aminoácido en la posición 1, y terminando con el aminoácido en la posición 118, y un segundo dominio 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 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

Caso 4-31266P1

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 CDR1 la secuencia de aminoácidos Asn-Phe-Ala-Phe-Asn, teninedo CDR2 la secuencia de aminoácidos Arg-Ile-Leu-Pro-Ser-Leu-Asp-Ile-Ala-Ser, y teniendo CDR3 la secuencia de aminoácidos Glu-Val-Asp-Gly-Gly-Gly-Phe, 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

43
P1

una cadena ligera humana, teniendo las 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.

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 en-
lace de antígeno que comprende:

a) un primer dominio que comprende, en secuencia, las
regiones hipervariables CDR1, CDR2, y CDR3, teniendo estas re-
giones hipervariables las secuencias de aminoácidos mostradas
en la SEQ ID No:1;

b) un segundo dominio que comprende las regiones hiper-
variables CDR1', CDR2', y CDR3', teniendo estas regiones hiper-
variables las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID
No:2; y

c) un enlazador peptídico que se enlaza ya sea a la ex-
tremidad 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 do-
minio;

y sus equivalentes directos.

Como es bien conocido, los cambios menores en una secuen-

102

cia 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):

(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 la SEQ ID No:1, 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 la SEQ ID No:1;

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

Caso 4-31266P1

SEQ ID Nos:1 y 2, 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 y las partes constantes idénticas a la molécula X', pero que tenga las regiones hipervariables CDR1, CDR2, CDR3, CDR1', CDR2', y CDR3' idénticas a las mostradas en las SEQ ID Nos: 1 y 2.

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.

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.

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, el anticuerpo anti-CD154

humano que comprende cuando menos:

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:1, 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:2, 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.

De una manera muy general, de acuerdo con lo anterior, se pro-

49
2
105

porcionan:

(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 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 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, 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 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

106

casetes de CDR sintéticos de doble cadena mediante síntesis del ADN de acuerdo con las secuencias dadas en las SEQ ID Nos: 1 y 2. 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

107

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 la SEQ ID No:1; 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

Caso 4-31266P1

No: 1, 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 una 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 la SEQ ID No: 2; 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
- b) una segunda parte que codifica una 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:2, 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:2, 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 la SEQ ID No:1, y en la SEQ ID No:2; 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 la SEQ ID No:2.

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 par-

Caso 4-31266P1

tes, se puede insertar un potenciador. La presencia de este elemento genético que se transcribe pero no se traduce, se puede 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 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 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 convencionales, 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

Caso 4-31266P1

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 un 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 ninguna 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 convenciona-

Caso 4-31266P1

les. 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.

De acuerdo con la presente invención, se ha encontrado que el anticuerpo humano anti-humano ABI793, tiene una especificidad de epítipo de antígeno deseable. Por consiguiente, se ha encontrado que el ABI793 reconoce un epítipo tanto humano así como de mono cinomolgo de antígeno CD154; este epítipo es diferente de los epítopos 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 sobre el CD154 humano monomérico como trimérico.

Caso 4-31266P1

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

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención (referidos posteriormente en la presente como el Anticuerpo de la Invención), exhiben valiosas propiedades farmacológicas, por ejemplo, interfieren con, o modulan 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:

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_x de ratón) sobre placas de microtitulación, y las placas se incuban, en la presencia o en ausencia de un inhibidor supuesto, con CD40 hu-

48
114

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 IC_{50} , 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 IC_{50} 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 IC_{50} encontrada para el enlace de CD154:CD40 (CD154 y CD40 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

Caso 4-31266P1

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 células 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 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.

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 in-

Caso 4-31266P1

munoglobulina superficial. Se estimulan células B purificadas (2.5×10^5 /mililitro; cultivos de 0.2 mililitros) por triplicado 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 cultivos 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 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 análisis MHC. 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 miligra-

Caso 4-31266P1

mos/kilogramo antes del transplante y después del transplante se completa, y luego en la misma dosis en días postoperatorios, 3, 10, 18, y 28, seguido por una sosis individual cada 28 días durante 5 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 Invención incluyen, por ejemplo, aspergilosis broncopulmonar alérgica; anemia hemolítica autoinmune; *Acantosis 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.

Caso 4-31266P1

co; 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 DiGeorge; 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; púrpu-

Caso 4-31266P1

ra 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, foliáceo 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; 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; 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; 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- injerto, por ejemplo células, tejidos, u órganos sólidos, por ejemplo islotes pancreáticos, médula ósea, tejido córneo, tejido neuronal, corazón, pulmón, corazón-pulmón combinados, riñón, hígado, intestino, páncreas, traquea, 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 Anti-

123
121

cuerpo 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 proliferación y diferenciación de células B o de respuestas de células T, la inducción o modulación de tolerancia de células T o prevención de procesos inflamatorios asociados con macrófagos, en un sujeto que necesite dicho tratamiento, cuyo método comprende administrar a este sujeto una cantidad no tóxica efectiva de un anticuerpo (humano) para CD154 como se da a conocer en la presente, por ejemplo ABI793;

2. El uso de un anticuerpo (humano) para 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 un anticuerpo (humano) para CD154 como se da a conocer en la presente, por ejemplo ABI793, en asociación con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable para la misma;

4. Un anticuerpo (humano) para CD154 como se da a conocer en la presente, por ejemplo ABI793, para utilizarse en la

724
122

Caso 4-31266P1

preparación de una composición farmacéutica útil en un método como se indica anteriormente.

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. Por ejemplo, el Anticuerpo de la Invención se puede utilizar en combinación con ciclosporina rapamicina o ascomicina, o sus análogos o derivados inmunosupresivos, por ejemplo ciclosporina A, ciclosporina G, FK-506, ABT-281, ASM981, rapamicina, 40-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina etcétera; corticosteroides; ciclofosfamida; azatiopreno; metotrexato; FTY720; leflunomida; mizoribina; ácido micofenólico; micofenolatomofetil; 15-desoxiespergualina 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, otros compuestos inmunomoduladores, por ejemplo CTLA4Ig 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.

Cuando el Anticuerpo de la Invención se administre en con-

Caso 4-31266P1

junto con otra terapia inmunosupresora/inmunomoduladora, o anti-inflamatoria, por supuesto, las dosificaciones del compuesto inmunosupresor, inmunomodulador, o anti-inflamatorio co-administrado variarán dependiendo del tipo de co-fármaco empleado, por ejemplo si es un esteroide o una ciclosporina, 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 un anticuerpo (humano) para CD154 como se da a conocer en la presente, por ejemplo ABI793, y una segunda sustancia de fármaco siendo esta segunda sustancia fármaco, un fármaco inmunosupresor, inmunomodulador, o anti-inflamatorio, por ejemplo como se indica anteriormente.

6. Una combinación farmacéutica, por ejemplo un estuche, para utilizarse en cualquier método como se define en 1 anteriormente, la cual comprende un anticuerpo (humano) para CD154 como se da a conocer en la presente, por ejemplo ABI793, en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, con cuando menos una composición farmacéutica que comprenda un fármaco inmunosupresor, inmunomodulador, o anti-inflamatorio. El estuche puede comprender instrucciones para su administración.

De preferencia el Anticuerpo de la Invención es una molé-

K3
C8
124

Caso 4-31266P1

cula enlazada de CD154 de acuerdo con el primero y el segundo aspecto de la invención. De una manera ventajosa, el Anticuerpo de la Invención es un anticuerpo humano, más preferiblemente el anticuerpo ABI793 o un equivalente directo del mismo.

La invención además describe a manera de ilustración solamente en los siguientes Ejemplos.

Los ratones transgénicos diseñados para exprezar el repertorio de IgG/ κ en lugar del repertorio de inmunoglobulina murina (Fishwild y colaboradores, 1996, Nat Biotechnol., 14, 845-851) se utilizan para generar anticuerpos para CD154 humano. Se inmunizan los ratones repetidamente, con una proteína recombinante de CD154 humana soluble que consiste del dominio extracelular de CD154 humano fusionado con cadena C κ (CD154- κ) de ratón. Para hacer la proteína más inmunogénica, se reticula el CD154 soluble con KLH. Se sigue cebo con CD154:KLH por inmunizaciones repetidas con células de una línea célula de humano recombinante que consitutivamente expresa la superficie CD154. Las células de bazo de estos ratones son inmortalizadas, se obtienen mediante tecnología de hibridoma y células de hibridoma de murino los cuales secretan anticuerpos anti-CD154 humanos del tipo IgG/ κ . Finalmente, estos anticuerpos se seleccionan mediante su reactividad a CD154 humano, y mediante su habilidad para inhibir el enlace de CD154 a CD40 como se mide en un ensayo competitivo tipo ELISA.

125
125

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 (4.1×10^7) 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 completado 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/k. 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.

Caso 4-31266P1

28
26

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 los siguientes secuencias de aminoácidos y ADN como se da en la SEQ ID No: 1 (cadena pesada y la SEQ ID No: 2 (cadena ligera).

SEQ. ID no. 1

```

1      10      20      30      40      50
QVQLVQSGAEVQKPGSSVKVSCKASGTTFS HTAFH WVRQVPGQGLEWVG RIIPSLDTAS
                                CDR1                                CDR2
60      70      80      90      100     110     118
YAGQVQDRVTITADEKSTSTAYDELSSLSIEDTANYTCAR HYDGGGF DTWGQQTLLVTVSS
                                CDR3

```

```

1                                     50
CAGGTCCAGC TGGTGCAGTC TGGGGCTGAG GTGCAGAAAC CTGGGTCCTC

51                                     100
GGTGAAGGTC TCCTGCAAGG CTTCTGGAGG CACCTTCAGC AACTTTGCTT

101                                     150
TCAACTGGGT GCGACAGGTC CCTGGACAAG GGCTTGAGTG GATGGGAAGG

151                                     200
ATCCTCCCTA GTCTTGATAT AGCAAGCTAC GCACAGAAGT TCCAGGACAG

```

Caso 4-31266P1

122
9
127

201 250
AGTCACGATT ACCGCGGACA AATCCACGAG CACAGCCTAC ATGGAGTTGA

251 300
GCAGCCTGAG ATCTGAGGAC ACGCCATGT ATTACTGTGC GAGAGAGGTG

301 350
GATGGAGGGG GTTTTGAATA CTGGGGCCAG GGAACCCCTGG TCACCGTCTC

351 354
CTC A

SEQ. ID no.2

1 10 20 30 40 50
DIQNTQSPSSLSASVQDRVTTC RAAGIISWLA WIDQKPEKAPKSLTY AAASLOE
CDR1' CDR2'

60 70 80 90 100 107
GVPSRPSGSGSGTDFTLFISSELPEDFATTC QQYHXPPI FGGGTKEIK
CDR3'

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 AGGTTGAGCG GCASTGGATC

```

201                                     250
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATTTTG

251                                     300
CAACTTATTA CTGCCAACAG TATAATAGTT ACCCGTTCAC TTTCGGCGGA

301                                     321
GGGACCAAGG TGGAGATCAA A

```

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 BIAcore. 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 xs ⁻¹] (n=3)	(2.34 ± 0.13) x 10 ⁴
Constante de índice de disociación	[s ⁻¹] (n=3)	(5.38 ± 0.43) x 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

Caso 4-31266P1

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 epítipo 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 1D).

Esto demuestra que el ABI793 reconoce un epítipo sobre el antígeno CD154 que es diferente de los epítopos 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 2) o bien de mono cinomolgo (Figura 3). En estos ensayos 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 epítopos respectivos reconocidos por los Mabs 5c8 y 24-31 anti-CD154 humano de ratón.

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 4) y Western blot (Figura 5). La Figura 3 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 los análisis Western blot. Bajo las condiciones de electroforesis 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 5 "ABI793", pista 1, fecha "A"), así como el dominio extracelular bacterianamente expresado de 15 kD del CD154 (Figura 5, "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 4), 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.

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 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,

132
132

. Caso 4-31266P1

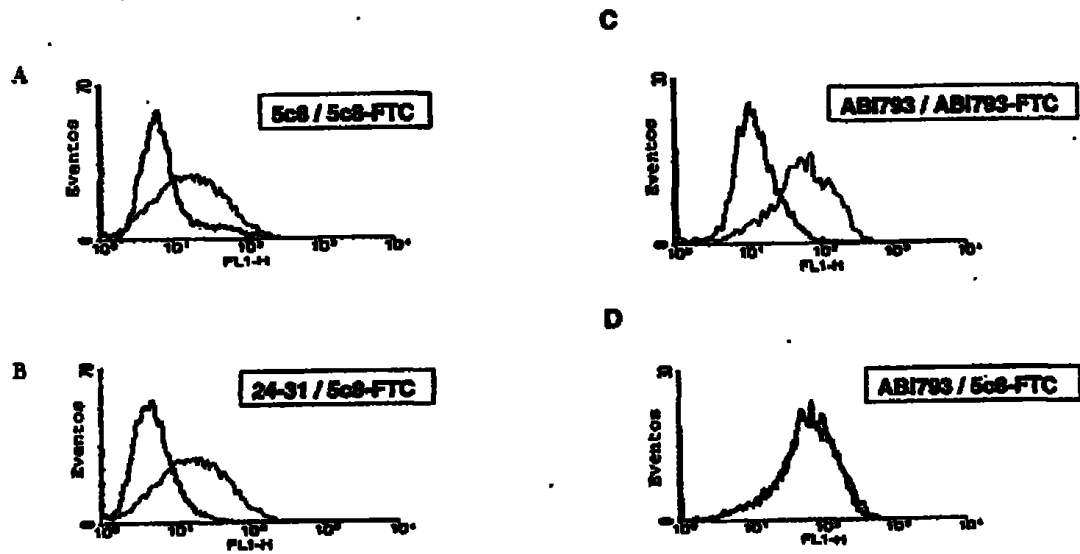
teniendo la CDR2' la secuencia de aminoácidos Ala-Ala-Ser-Ser-Leu-Gln-Ser, y teniendo la CDR3' la secuencia de aminoácidos Gln-Gln-Tyr-Asn-Ser-Tyr-Pro-Phe-Tyr;

y sus equivalentes directos.

por ejemplo, anticuepos humanos para CD154, por ejemplo, los dominios variables de tanto las cadenas ligeras y pesadas son de origen humano, por ejemplo como se muestra en la SEQ ID No:1 y la SEQ ID No: 2, por ejemplo ABI793,

un proceso para su producción, su uso como un producto farmacéutico, una composición farmacéutica que comprenda una molécula de CD154 y un método de tratamiento utilizando una molécula de enlace CD154, sustancialmente, como se define y describe anteriormente en la presente.

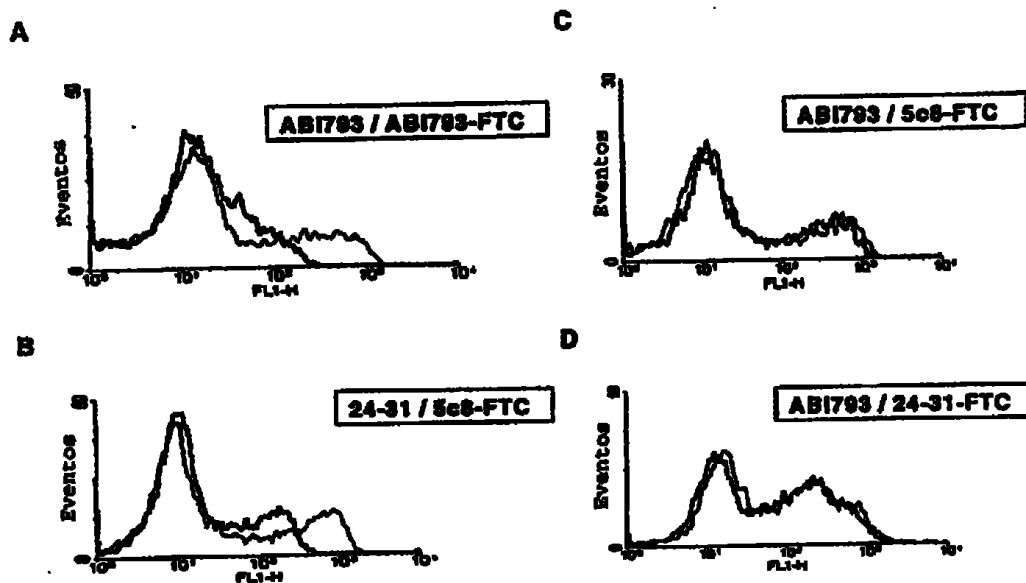
Figura 1: Análisis Epitope: experimentos de bloqueo cruzado utilizando células Jurkat D1.1



Estando con etiqueta FCT, mAbs como se indica, solo (línea regular) o después antes de la incubación con el anti-CD154 sin etiqueta mAb (línea negra).

103

Figura 2: Análisis Epitope: experimentos bloqueo cruzado utilizando células T humanas activadas



Como en la Figura 1, pero utilizando CD4 positivo purificado de células humanas T que son activadas durante 6 horas con PMA/ionomicina antes de empezar.

by 28

Figura 3: Análisis Epitope: experimentos bloqueo cruzado utilizando células T de mono clonologas activadas

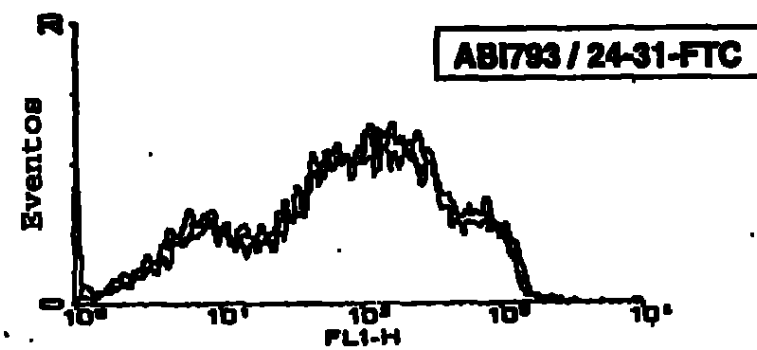
A



B



C

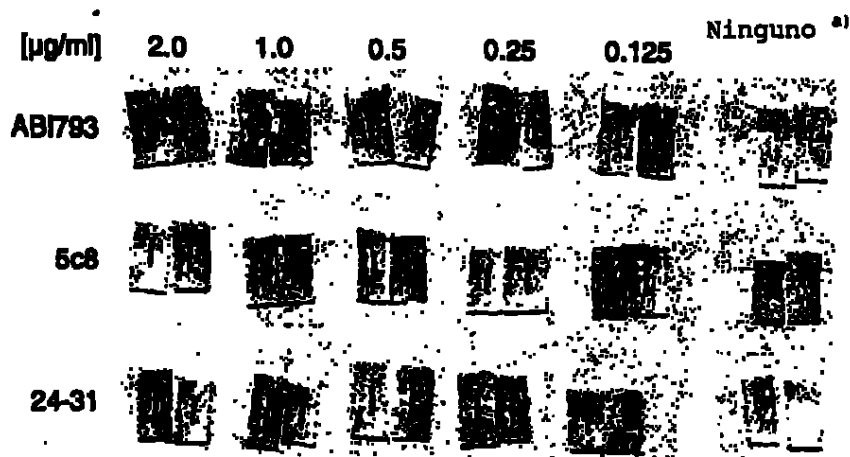


Como en la Figura 1, pero utilizando células T de monoclonológicas CD4 positivo purificado son activadas durante 4 horas con PMA/ionomicina antes de empezar.

Figura 4: Detección de CD254 humano recombinante trimérico

Anticuerpo

Anti-CD154



1 microgramo de CD154 humano recombinante soluble (es decir, la proci3n extracelular de CD154 humana fusionada al C_α de rat3n) se mancha en ranura en un filtro de nitrocelulosa. Despu3s de bloquear la membrana con BSA al 5 por ciento, se incuban individuos desnudos durante 1 hora con varias concentraciones de los anticuerpos CD154 antihumanos (como se indica). Anticuerpos enlazados son luego revelados mediante incubaci3n durante 45 minutos con tanto fosfatasa aparejada alcalina, IgG de meta antihumana espec3fica de cadena γ (para

Caso 4-31266P1

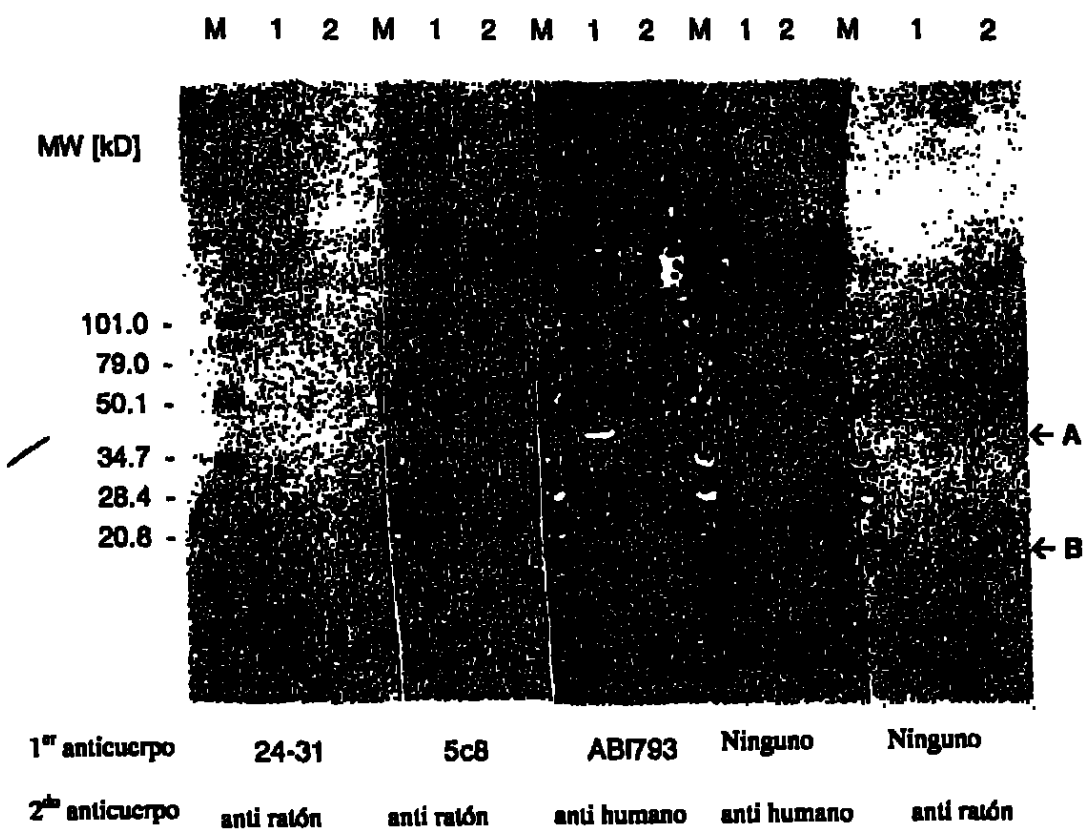
137
137

ABI793) como IgG de meta antirratón (para 5c8 y 24-31) seguido por una reacción estadar con BCIP/NBT.

a) Para controlar la reacción cruzada con parte de C_r de ratón del CD154 recombinante, se incuban desnudos con el segundo anticuerpo solo respectivo.

Fig 5
138

Figura 5: Detección de CD154 humano recombinante monomérico



5 series de muestras idénticas de CD154 humano recombinante, tanto en forma de proteína fusionada consisten de la parte extracelular de CD154 fusionada al C₂ como la porción extracelular sol, expresada en *E.coli*, se electroporizan en un gel gradiente PAGE de 4 a 20 por ciento. Después se corta la mancha en la membrana de nitrocelulosa, y los individuos desnudos se incuban secuencialmente durante 1 hora cada uno con anticuerpos de CD154 antihumano como se indica. Los anticuerpos enlazados luego se revelan mediante incubación durante 45 minutos con un segundo anticuerpo específico de cadena γ

16/189

Caso 4-31266P1

fosfatasa aparejada alcalina (IgG anti ratón de meta y IgG antihumano de meta, respectivamente), seguido por una reacción estandar con BCIP/NBT.

Senda M: marca premanchada; Senda 1: proteína fusionada C_x de ratón; Senda 2: parte de CD154 humano extracelular expresada bacteriamente.

2do. EXAMEN DE FORMA PATENTE DE INVENCION

Folio 142

Radicación no 01-20763

Concepto Técnico no 231 Clasificación Internacional de Patentes A 61 K48/00/C12N15/13

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 38 de la Decisión 488 se determinó que esta solicitud de Patente de Invención:

- SI ☒ NO ☐ Contiene un resumen de la invención (Art.26-e).**
- SI ☒ NO ☐ Contiene el título o nombre de la invención (Art.27-d).**
- SI ☒ NO ☐ Contiene la descripción de la invención (Art.26-b).**
- SI ☐ NO ☐ NO ES APLICABLE ☒ Contiene los dibujos necesarios para comprender la invención (Art.26-d)**
- SI ☒ NO ☐ Contiene una o más reivindicaciones. (Art.26-c).**
- SI ☐ NO ☐ NO ES APLICABLE ☒ Han sido desarrollados los productos y/o procedimientos a partir de recursos genéticos o de sus productos derivados de los que cualquiera de los Países Miembros es país de origen. (Art. 26- h).**
- SI ☐ NO ☐ NO ES APLICABLE ☒ Los productos y/o procedimientos han sido obtenidos o desarrollados a partir de los conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas, afroamericanas, o locales de los países miembros, de acuerdo a lo establecido en la Decisión 391 y sus modificaciones y reglamentaciones vigentes.(Art.26-l).**
- SI ☒ NO ☐ La invención se refiere a un producto relativo a un material biológico. (Art.26-J).**
- SI ☒ NO ☐ La prioridad coincide con la materia reivindicada.**
- SI ☒ NO ☐ CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS**

OBSERVACIONES Y OTROS: SI ☐ NO ☒ ver hoja(s) anexa(s)

EXAMINADOR TÉCNICO
202049
Bogotá D. C., ENERO 24 DE 2003

Folio 143

2020
Bogotá DC

Doctor(a)
JIMENA ESCOBAR URIBE
Apoderado(a)

REFERENCIA:	Radicación No.	01-20763
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	416
	Oficio No.	120
	Folios	001

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en los artículos 26 y 27 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, y en las demás disposiciones vigentes sobre la materia, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial, conforme lo establece el artículo 40 de la misma Decisión.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC, a los

31 ENE. 2003


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

528

202049