



No. 12-171924- -00000-0000

Fecha: 2012-10-01 16:36:24 Dep. 2020 DIR.NUEVAS
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: ANTICUERPOS ANTI-CD40.

SOLICITANTE: BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

DIRECCIÓN: Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein
Alemania

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 29 de Septiembre de 2012

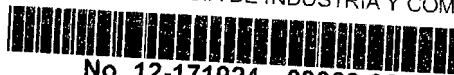
P2012/000109

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS I TDA.



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-171924- 00000-0000

Fecha: 2012-10-01 16:36:24
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 5

PETITORIO - FORMULARIO

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2012/000109

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **BOEHRINGER INGELHEIM
INTERNATIONAL GMBH**

Dirección: Binger Strasse 173, 55216
Ingelheim Am Rhein

Nacionalidad o Domicilio: Alemania

Lugar de Constitución: Alemania

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá,
Colombia

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2011/030427

Fecha

Marzo 30, 2011

Publicación Internacional No. WO 2011/123489

Fecha

Octubre 06, 2011

6

Título (54) **ANTICUERPOS ANTI-CD40.**

Clasificación Internacional (51) C07K 16/28.

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Marzo 31, 2010

(31) Número de Solicitud

61/319.574

9

Comprobante de pago No. 12-0097271

Fecha

Septiembre 21, 2012

2

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones. Declaración bajo la Regla 4.17 (ii) del PCT.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☒

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

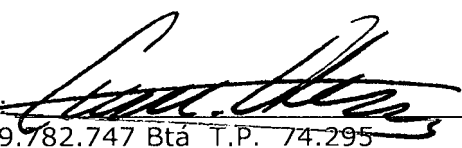
FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:


C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

3

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2011/030427

Rachel BARRETT

Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.,
900 Ridgebury Road, P.O. Box 368, Ridgefield,
Connecticut 06877-0368

Estados Unidos de América

Alemania

Nacionalidad: Estadounidense

Scott BRODEUR

Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.,
900 Ridgebury Road, P.O. Box 368, Ridgefield,
Connecticut 06877-0368

Estados Unidos de América

Alemania

Nacionalidad: Estadounidense

Keith A CANADA

Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.,
900 Ridgebury Road, P.O. Box 368, Ridgefield,
Connecticut 06877-0368

Estados Unidos de América

Alemania

Nacionalidad: Estadounidense

Tobias LITZENBURGER

Boehringer Ingelheim GmbH,
Corporate Patents
Binger Strasse 173,
55216 Ingelheim Am Rhein

Alemania

Nacionalidad: Alemana

Sanjaya SINGH

Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.,
900 Ridgebury Road, P.O. Box 368, Ridgefield,
Connecticut 06877-0368

Estados Unidos de América

Alemania

Nacionalidad: Estadounidense

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0097271

Bogotá D.C., Septiembre 21 de 2012 - 15:09:39

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	493223371	20/09/2012	4.970.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
			\$590.000.00

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-171924- -00000-0000

Fecha: 2012-10-01 16:36:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Septiembre 21 de 2012 - 15:09:41



No. 12-171924-00000-0000

Fecha: 2012-10-01 16:36:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO L ☐

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
CD - Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

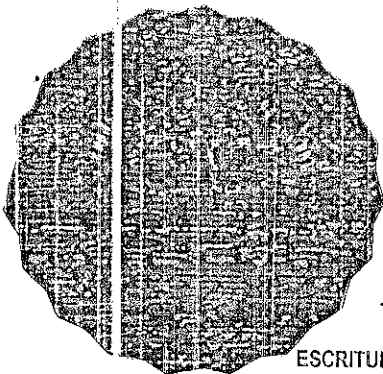
(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

<i>Item</i>	<i>Unidad de Conservación</i>
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
<i>Item</i>	<i>Soporte Documental</i>
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
10	Otro

Observaciones:

Anexan 1 C.D.



TESTIMONIO

ESCRITURA: 001416
MINUTA: 000657

K: 007735

DELEGACION DE PODER
QUE OTORGA
BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH
REPRESENTADO POR
JANNE IVETTE LUQUE CARDENAS
A FAVOR DE
CARLOS REINALDO OLARTE

=====

INTRODUCCION

EN LA CIUDAD DE LIMA AL VEINTISEIS DE JULIO DEL DOS MIL DIEZ, ANTE MI, MARIO GINO BENVENUTO MURGUIA, NOTARIO DE ESTA CAPITAL.

COMPARECEN:

JANNE IVETTE LUQUE CARDENAS, QUIEN MANIFIESTA SER DE NACIONALIDAD: PERUANA, DE ESTADO CIVIL CASADA, DE PROFESION U OCUPACION: ABOGADA Y DOMICILIAR EN AVENIDA REPUBLICA DE PANAMA 3531, OFICINA 1203, DISTRITO DE SAN ISIDRO PROVINCIA Y DEPARTAMENTO DE LIMA, DEBIDAMENTE IDENTIFICADA CON DOCUMENTO NACIONAL DE IDENTIDAD NUMERO 29562321, QUIEN PROCEDE EN REPRESENTACION DE BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH, CUYAS FACULTADES CONSTAN EN EL PODER OTORGADO CON FECHA QUINCE DE JULIO DEL DOS MIL DIEZ, DEBIDAMENTE LEGALIZADO POR EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES CON FECHA VEINTITRES DE JULIO DEL DOS MIL DIEZ, QUE SE INSERTA, LA COMPARECIENTE ES INTELIGENTE EN EL IDIOMA CASTELLANO, QUIEN SE OBLIGA CON CAPACIDAD, LIBERTAD Y CONOCIMIENTO SUFICIENTE DE CONFORMIDAD CON EL EXAMEN QUE LE HE EFECTUADO DE LO QUE DOY FE; Y ME ENTREGÓ UNA MINUTA QUE ARCHIVO EN SU LEGAJO RESPECTIVO BAJO EL NUMERO DE ORDEN CORRESPONDIENTE Y CUYO TENOR LITERAL ES COMO SIGUE:

MINUTA:

SEÑOR NOTARIO:

SÍRVASE EXTENDER EN SU REGISTRO DE ESCRITURAS PÚBLICAS UNA DE DELEGACION DE PODER QUE OTORGA LA SEÑORA IVETTE LUQUE CARDENAS, IDENTIFICADA CON DNI N° 29562321, DE NACIONALIDAD PERUANA, ESTADO CIVIL CASADA, OCUPACIÓN ABOGADO Y CON DOMICILIO EN AV. REPÚBLICA DE PANAMÁ N° 3531, OFICINA 1203, SAN ISIDRO, QUIEN ACTÚA EN REPRESENTACIÓN DE BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH, UNA EMPRESA CONSTITUIDA Y EXISTENTE BAJO LAS LEYES DE ALEMANIA, CON DOMICILIO EN BINGER STRASSE 173, 55216 INGELHEIM AM RHEIN, ALEMANIA, SEGÚN PODER OTORGADO CON FECHA 13 DE OCTUBRE DE 2009, Y A QUIEN EN ADELANTE SE LE DENOMINARÁ EL PODERDANTE; A FAVOR DEL SEÑOR CARLOS REINALDO OLARTE, IDENTIFICADO CON CÉDULA N° 79.782.747, A QUIEN EN ADELANTE SE LE DENOMINARÁ EL APODERADO; EN LOS SIGUIENTES TÉRMINOS Y CONDICIONES:

PRIMERO: CON FECHA 15 DE JULIO DE 2010, LA EMPRESA BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH, UNA EMPRESA CONSTITUIDA Y EXISTENTE BAJO LAS LEYES DE ALEMANIA, CON DOMICILIO EN BINGER STRASSE 173, 55216 INGELHEIM AM RHEIN, ALEMANIA, OTORGÓ PODER A FAVOR DE EL PODERDANTE, EL CUAL USTED SEÑOR NOTARIO SE SERVIRÁ INSERTAR. ==

SEGUNDO: POR EL PRESENTE DOCUMENTO, EL PODERDANTE DELEGA PODER A FAVOR DE EL APODERADO PARA QUE REPRESENTÉ EN LA REPÚBLICA DE COLOMBIA A LA SOCIEDAD BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH, TAL COMO CONSTA EN EL PODER ADJUNTO, ANTE CUALQUIER AUTORIDAD ADMINISTRATIVA O JUDICIAL, INCLUYENDO LA SECRETARÍA Y TRIBUNAL DE JUSTICIA DE LA COMUNIDAD ANDINA, PARA EL INICIO, TRAMITACIÓN, OBTENCIÓN, DEFENSA Y HACER RESPETAR TODAS Y CUALQUIERA DE LAS PATENTES DE INVENCION, MODELOS DE UTILIDAD, DISEÑOS INDUSTRIALES, MARCAS, LEMAS COMERCIALES, NOMBRES COMERCIALES, PROTECCIÓN DE DATOS DE PRUEBA, PROTECCIÓN DE SECRETOS EMPRESARIALES, DERECHOS DE AUTOR, REGISTRO DE NOMBRES DE DOMINIO, O SEGUIMIENTO DE PROCEDIMIENTOS EN MATERIAS TALES COMO PROPIEDAD INTELECTUAL.

Av. Juan de Arona N° 545 Altura Cdra. 31 de la Av. Arequipa – San Isidro
Central: 719 – 1667 / 719 – 1668 / 719 – 1669 / Telefax.: 717 – 1031
www.notariabenvenuto.com / e-mail: notario@notariabenvenuto.com

Handwritten text, possibly a signature or date, within a rectangular box.

Handwritten text, possibly a signature or date, within a rectangular box.

Handwritten mark or signature on the right side of the page.

TESTIMONIO

EL APODERADO ACTUANDO EN FORMA INDIVIDUAL PODRÁ DEMANDAR, RECONVENIR, CONTESTAR DEMANDAS Y RECONVENIONES, PRESENTAR TODO TIPO DE SOLICITUDES, RECURSOS, RESPUESTAS U OPOSICIONES, PRESENTAR TODO TIPO DE RECURSOS DE IMPUGNACIÓN, PRESENTAR DECLARACIONES, JURADAS O NO, PRESENTAR CUALQUIER OTRO RECURSO O REMEDIO PROCESAL PERMITIDO POR LEY, PAGAR IMPUESTOS Y ANUALIDADES, SOLICITAR TESTIMONIOS, RENUNCIAR A LOS DERECHOS DE REGISTRO SOBRE UN ELEMENTO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL, DESISTIRSE DEL PROCESO Y DE LA PRETENSION, ALLANARSE A LA PRETENSION, CONCILIAR, TRANSIGIR, SOMETER A ARBITRAJE LAS PRETENSIONES CONTROVERTIDAS EN EL PROCESO, SOLICITAR Y EJECUTAR MEDIDAS CAUTELARES ASÍ COMO VISITAS INSPECTIVAS, RATIFICAR LOS ACTOS JURÍDICOS PROCESALES SUSCRITOS CON ANTERIORIDAD AL OTORGAMIENTO Y/O PRESENTACIÓN DEL PRESENTE PODER, SUSTITUIR O DELEGAR LA REPRESENTACIÓN, REVOCAR LOS PODERES OTORGADOS, RECIBIR NOTIFICACIONES EN NOMBRE DE LA COMPAÑÍA Y LOS DEMÁS ACTOS QUE EXPRESE LA LEY. ===== AGREGUE USTED SEÑOR NOTARIO, LAS CLÁUSULAS DE LEY, E INSERTE EL PODER AL QUE SE HA HECHO REFERENCIA. ===== LIMA, 21 DE JULIO DE 2010. =====

FIRMADO.- UNA FIRMA ILEGIBLE.- =====

ABOGADO QUE AUTORIZA, UN SELLO QUE DICE.- JURGEN STROBACH FLORIAN.- ABOGADO.- C.A.L. 30548.- UNA FIRMA ILEGIBLE.- =====

INSERTO UNO: TRADUCCION OFICIAL =====

MARIO GINO BENVENUTO MURGUIA, ABOGADO NOTARIO DE LIMA, CERTIFICO QUE HE TENIDO A LA VISTA LA TRADUCCION OFICIAL DEL PODER ESPECIAL, DEBIDAMENTE LEGALIZADO POR EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES CON FECHA VEINTITRES DE JULIO DEL DOS MIL DIEZ, CUYO TENOR LITERAL ES COMO SIGUE: =====

TRADUCCIÓN OFICIAL

TRA. N° TOI.0077.10

Primera página del documento original:

PODER ESPECIAL de fecha 15 de julio de 2010 redactado en idioma castellano e inglés

Segunda página del documento original:

UR. Nr.: 1446/2010

Por la presente se certifica que las firmas que anteceden de:

- Dr. Michael Kompter, nacido el 11 de mayo de 1955, con domicilio en 55216 Ingelheim am Rhein, Binger Straße 173.
- Dr. Christian Hauke, nacido el 31 de agosto de 1947, con domicilio en 55216 Ingelheim am Rhein, Binger Straße 173.

a quienes he conocido en persona, han sido estampadas en mi presencia

Asimismo, certifico que Boehringer Ingelheim International GmbH es una sociedad debidamente constituida bajo las leyes de la República Federal de

1
Estados Unidos 688 - Lima 11 - Perú - Tels.: (511) 460-1659 • (511) 463-1167 • Fax: (511) 463-4548
maemim@terra.com.pe

Av. Juan de Arona N° 545 Altura Cdra. 31 de la Av. Arequipa - San Isidro
Central: 719 - 1667 / 719 - 1668 / 719 - 1669 / Telefax.: 717 - 1031
www.notariabenvenuto.com / e-mail: notario@notariabenvenuto.com

Página 2 de 8

TESTIMONIO

TRA. N° TOI.0077.10

Alemania, con domicilio en Binger Strasse 173, 55216
Ingelheim am Rhein, Alemania.

Dicha sociedad se encuentra inscrita en el Registro
Mercantil del Juzgado de Distrito de Bingen, bajo el
número HR B 1063 desde el 14 de mayo de 1968. Dicha
inscripción ha sido transferida por ley al Registro
Mercantil del Juzgado de Distrito de Mainz, donde se
encuentra inscrita bajo el número HR B 21063 desde el 28
de diciembre de 2005.

Asimismo, certifico que los doctores Michael Kompter y
Christian Hauke, han sido autorizados para firmar el
documento que antecede y actualmente se encuentran
debidamente autorizados para firmar a nombre de
Boehringer Ingelheim International GmbH en calidad de
apoderados.

Ingelheim am Rhein, 15 de julio de 2010

(firmado ilegible)

Notario Público

Mary Ann Montecarlo Medina
Traductora Pública Juramentada
Registro IVI N° 106

TESTIMONIO

TRA. N° TOI.0077.10

Reverso de la segunda página del documento original:

(sello en idioma extranjero distinto al inglés, de fecha 16 de julio de 2010)

(sello en idioma castellano del Consulado del Perú, de fecha 20 de julio de 2010)

(sello) MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
DIRECCIÓN GENERAL DE POLÍTICA CONSULAR

Legalización N° 092720

Se legaliza la firma que antecede del Sr.(a)
Alfredo Arecco-Sablich sin juzgar el contenido
del documento

Lima, 23 de julio de 2010

(fdo.) Maribel del Rosario LUYO JAVIER

Departamento de Legalizaciones

Dirección de Trámites Consulares/sello

La infrascrita, Traductora Pública Juramentada,
certifica que la presente traducción es fiel y
correcta del texto original en idioma Castellano.....
adjunto. Esta traducción no debe interpretarse
como reconocimiento de la autenticidad
del documento traducido.

En fe de lo cual, firmo y sello en.....Lima.....
a los...26...días del mes de...Julio...de...2010..

Mary Aníbal Montenegro Medina
Traductora Pública Juramentada
Registro JVT N° 105

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
DIRECCIÓN GENERAL DE POLÍTICA CONSULAR
Legalización N°

Se legaliza la firma que antecede del Sr.(a)

SIN JUZGAR EL CONTENIDO DEL DOCUMENTO



Julia F. Celia Moreano de Dueñas
Departamento de Legalizaciones
Dirección de Trámites Consulares
LIMA 27 JUL 2010

Estados Unidos 888 - Lima 11 - Perú - Telfs.: (511) 460-1859 • (511) 463-1167 • Fax: (511) 463-4548
maernm@terra.com.pe

Av. Juan de Arona N° 545 Altura Cdra. 31 de la Av. Arequipa - San Isidro
Central: 719 - 1667 / 719 - 1668 / 719 - 1669 / Telefax: 717 - 1031
www.notariabenvenuto.com / e-mail: notario@notariabenvenuto.com

TESTIMONIO

FERNÁNDEZ - DÁVILA & BUENO
ABOGADOS

PODER ESPECIAL

Consta por el presente documento el Poder Especial que otorga [insertar nombre de poderdante], domiciliada en [insertar domicilio] constituida de acuerdo a las leyes de [insertar país de constitución], representada por su [insertar cargo en la cía.] Sr.(a) [insertar nombre del representante de la cía.], a favor de FERNÁNDEZ DÁVILA ABOGADOS SAC, CARLOS FERNÁNDEZ DÁVILA WINKLER, ROSA BUENO MERA, JULIETA DEL PILAR TIJERO MARTINO, DIEGO CORDOVA FLORES, IVETTE LUQUE CARDENAS y/o CLARISA SILES VASCONES, domiciliados en Av. República de Panamá 3531, Oficina 1203, San Isidro, Lima, Perú, para que la representen en la República de Perú, República de Bolivia, República de Chile, República de Colombia, República de Ecuador y República Bolivariana de Venezuela, ante cualquier autoridad administrativa o judicial, incluyendo la Secretaría y Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina, para el inicio, tramitación, obtención, defensa y hacer respetar todas y cualquiera de las patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas, lemas comerciales, nombres comerciales, protección de datos de prueba, protección de secretos empresariales, derechos de autor, registro de nombres de dominio, o seguimiento de procedimientos en materias tales como Propiedad Intelectual.

Los apoderados podrán ejercer el presente poder actuando en forma individual e indistinta, y gozarán de las siguientes facultades, tales como demandar, reconvenir, contestar demandas y reconveniciones, presentar todo tipo de solicitudes, recursos, respuestas u oposiciones, presentar todo tipo de recursos de impugnación, presentar declaraciones, juradas o no, presentar cualquier otro recurso o remedio procesal permitido por ley, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, renunciar a los derechos de registro sobre un elemento de la propiedad industrial, desistirse del proceso y de la pretensión, allanarse a la pretensión, conciliar, transigir, someter a arbitraje las pretensiones controvertidas en el proceso, solicitar y ejecutar medidas cautelares así como visitas inspectivas, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal, revocar los poderes otorgados, recibir notificaciones en nombre de la compañía y los demás actos que exprese la ley.

Suscrito en el de de 2010

ESTE PODER REQUIERE DE LEGALIZACIÓN NOTARIAL (PRECISANDO QUE EL REPRESENTANTE TIENE LAS FACULTADES PARA OTROGARLO Y QUE ESTUVO PRESENTE AL MOMENTO DE HACERLO) Y DE CONSUL PERUANO (CUANDO ES OTORGADO EN EL EXTRANJERO)

SPECIAL POWER OF ATTORNEY

By means of this Special Power of Attorney Boehringer Ingelheim International GmbH with address in Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany and incorporated under the laws of Germany duly represented by its Authorized Signatories Dr. Michael KOMPTER and Dr. Christian HAUKE, grants to FERNÁNDEZ DÁVILA ABOGADOS SAC, CARLOS FERNÁNDEZ DÁVILA WINKLER, ROSA BUENO MERA, JULIETA DEL PILAR TIJERO MARTINO, DIEGO CORDOVA FLORES, IVETTE LUQUE CARDENAS and/or CLARISA SILES VASCONES, with address at Av. República de Panamá 3531, Oficina 1203, San Isidro, Lima, Perú, the powers to represent in the Republic of Perú, the Republic of Bolivia, Republic of Chile, Republic of Colombia, Republic of Ecuador and the Bolivarian Republic of Venezuela before any administrative or judicial authority of any class, including the Andean Secretariat and the Andean Court of Justice to initiate, prosecution, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Invention, Utility Models, Industrial Designs, Trademarks, Trade Names, Commercial Emblems, Test Data Protection, Protection of Trade Secrets, Copyrights, Registration of Domain names and handle proceedings related to Intellectual Property.

The empowered representatives will exert this power of attorney acting individually and indistinctly with the following powers, having authority to claim, to counter-claim, to answer complaints and counter-claims, to file petitions, recourses, replies and oppositions, to withdraw the registration of an industrial property element, to abandon the action and the requested relief, to defend a suit, to file standard or sworn declarations, to file all sort of petitions, appeal and motions permitted by law, pay taxes and annuities, request testimonies, to accept in total or part the demanded pretensions, conciliate, settle, submit to arbitration the contradicted pretensions in the process, to require and execute precautionary measures and inspections among others, to ratify all the acts in regular procedures and proceedings entered into before the granting and/or presentation of this document, substitute or delegate the representation, revoke such substitutions, receive notifications on behalf of the Company and for the rest of the acts which the law provides.

Executed in Ingelheim, on 15th July of 2010

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH
ppa. ppa.

Dr. Michael KOMPTER
Authorized Signatory

Dr. Christian HAUKE
Authorized Signatory

THIS POWER OF ATTORNEY REQUIRES LEGALIZATION OF A NOTARY (STATING THAT THE REPRESENTATIVE HAS ENOUGH POWERS TO GRANT IT AND APPEARED AND EXECUTED IT PERSONALLY) AND OF A PERUVIAN CONSUL (WHEN GRANTED ABROAD)

Av. Juan de Arona N° 545 Allura Cdra. 31 de la Av. Arequipa - San Isidro
Central: 719 - 1667 / 719 - 1668 / 719 - 1669 / Telefax.: 717 - 1031
www.notariabenvenuto.com / e-mail: notario@notariabenvenuto.com

RECEIVED
NOV 19 1950

TESTIMONIO

UR. Nr. 1446/2010

It is herewith certified that above signatures of:

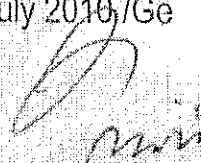
- Dr. Michael **Kompter**, born 11th day of May 1955, with its business address at 55216 Ingelheim am Rhein, Binger Straße 173,
 - Dr. Christian **Hauke**, born 31st day of August 1947, with its business address at 55216 Ingelheim am Rhein, Binger Straße 173,
- personally known,
were duly given in my presence.

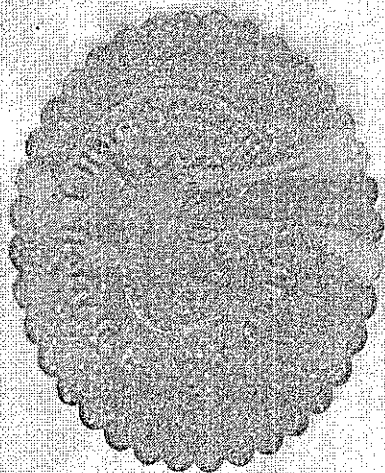
It is herewith certified that **Boehringer Ingelheim International GmbH** is a corporation duly organized and existing under the laws of the Federal Republic of Germany having its principal place of business at Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany.

It had been entered into the Commercial Register of the District Court of Bingen under HR B 1063 as of 14th day of May 1968. This registration was transferred by law to the Commercial Register of the District Court of Mainz, where it has been registered under HR B 21063 since 28th day of December 2005.

Furthermore, I certify that Dr. Michael Kompter and Dr. Christian Hauke were authorized to sign the foregoing document and still are duly authorized to sign on behalf as procurists of **Boehringer Ingelheim International GmbH**.

Ingelheim am Rhein, the 15th day of July 2010 /Ge


Notary public



1. *State of the world...*
...
...

1910
1911

1912

TESTIMONIO

AL DORSO: =====

910 E 1

Die Echtheit vorstehender Unterschrift des
Notars Horst Heintskill in Ingelheim am Rhein
und die Echtheit des beigedruckten Dienstsiegels
werden hierdurch bestätigt. Zugleich wird bescheinigt, dass der
Vorgenannte zur Vornahme der Amtshandlung gesetzlich befugt war.



Kostenrechnung:

Gebühr für die Erteilung
der Legalisation:

Wert: 50.000,00 €

JVKostO v. 26.7.1957

i.V.m. § 45 KostO

Gebühr: 33,00 €

Mainz, 16.07.10

Heppes-Schwarz
Heppes-Schwarz
Amtsinspektorin



Mainz, den 16. Juli 2010
Die Präsidentin des Landgerichts
In Vertretung

Dr. Matthias Friedrich
Dr. Matthias Friedrich
Vorsitzender Richter am Landgericht

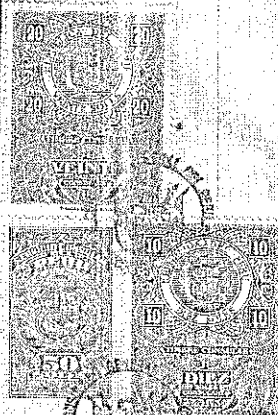
CONSULADO GENERAL DEL PERU
FRANCFORT DEL MENO

Se legaliza la firma de:
DR. MATTHIAS FRIEDRICH

Quien desempeña el cargo de:
**REPRESENTANTE DEL PRESIDENTE
DEL TRIBUNAL REGIONAL
EN MAINZ**

Nº de Orden: 0363
Nº de Asignación: AA7A
Nº de Fianza: 22.4
Derechos percibidos: S/C: 80.000 €
E: 72.000 €

Frankfurt del Meno, 20 de Julio de 2010



Alfredo Arecco-Sablich
ALFREDO ARECCO-SABLICH
Consul General del Perú



MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
DIRECCION GENERAL DE POLITICA CONSULAR

Legalización Nº 0363/2010

Se legaliza la firma que antecede del Sr.(a)

Alfredo Arecco-Sablich
SIN JUZGAR EL CONTENIDO DEL DOCUMENTO

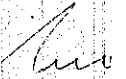
Maribel del Rosal Luyo Joylar
Maribel del Rosal Luyo Joylar
Departamento de Legalización
Dirección de Asesoría Consular



LIMA, 23 JUL 2010

Esta cartilla está en blanco. Cualquier
texto que se consigne carece de valor

DE NOT
a y sellos
en al (la)
P
Nº 1167
ma del N


Ramón Gortázar
Nº 1167

Mario Gino Benvenuto Murguía

ABOGADO NOTARIO DE LIMA

TESTIMONIO

INSERTO. =====

DE CONFORMIDAD CON LA LEY DEL NOTARIADO, ARTICULO 59, INCISO D), TRANSCRIBO: =====

CÓDIGO PROCESAL CIVIL: "ARTÍCULO 74.- FACULTADES GENERALES.- LA REPRESENTACIÓN JUDICIAL CONFIERE AL REPRESENTANTE LAS ATRIBUCIONES Y POTESTADES GENERALES QUE CORRESPONDEN AL REPRESENTADO, SALVO AQUELLAS PARA LAS QUE LA LEY EXIGE FACULTADES EXPRESAS. LA REPRESENTACIÓN SE ENTIENDE OTORGADA PARA TODO EL PROCESO, INCLUSO PARA LA EJECUCIÓN DE LA SENTENCIA Y EL COBRO DE COSTAS Y COSTOS, LEGITIMANDO AL REPRESENTANTE PARA SU INTERVENCIÓN EN EL PROCESO Y REALIZACIÓN DE TODOS LOS ACTOS DEL MISMO, SALVO AQUELLOS QUE REQUIERAN LA INTERVENCIÓN PERSONAL Y DIRECTA DEL REPRESENTADO." =====

CÓDIGO PROCESAL CIVIL: "ARTÍCULO 75.- FACULTADES ESPECIALES.- SE REQUIERE EL OTORGAMIENTO DE FACULTADES ESPECIALES PARA REALIZAR TODOS LOS ACTOS DE DISPOSICIÓN DE DERECHOS SUSTANTIVOS Y PARA DEMANDAR, RECONVENIR, CONTESTAR DEMANDAS Y RECONVENIONES, DESISTIRSE DEL PROCESO Y DE LA PRETENSIÓN, ALLANARSE A LA PRETENSIÓN, CONCILIAR, TRANSIGIR, SOMETER A ARBITRAJE LAS PRETENSIONES CONTROVERTIDAS EN EL PROCESO, SUSTITUIR O DELEGAR LA REPRESENTACIÓN PROCESAL Y PARA LOS DEMÁS ACTOS QUE EXPRESE LA LEY. EL OTORGAMIENTO DE FACULTADES ESPECIALES SE RIGE POR EL PRINCIPIO DE LITERALIDAD. NO SE PRESUME LA EXISTENCIA DE FACULTADES ESPECIALES NO CONFERIDAS EXPLÍCITAMENTE." =====

CONCLUSION: =====

FORMALIZADO EL INSTRUMENTO LA COMPARECIENTE LE DIO LECTURA, DESPUES DE LO CUAL SE AFIRMA Y RATIFICA EN SU CONTENIDO, DECLARANDO QUE SE TRATA DE UN ACTO VALIDO Y NO SIMULADO, MANIFESTANDO IGUALMENTE CONOCER LOS ANTECEDENTES Y/O TITULOS QUE SE ORIGINAN POR EL PRESENTE INSTRUMENTO Y DECLARANDO RECONOCER COMO SUYA LA FIRMA DE LA MINUTA QUE LA ORIGINA. =====

DEJO CONSTANCIA DE HABER ADVERTIDO A LA INTERESADA DE LOS EFECTOS LEGALES DEL PRESENTE INSTRUMENTO NOTARIAL. =====

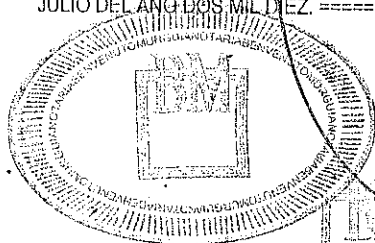
LA PRESENTE ESCRITURA PUBLICA SE INICIA EN LA FOJA DE PAPEL NOTARIAL CON NUMERO DE SERIE B Nº0706090 Y CONCLUYE EN LA FOJA DE PAPEL NOTARIAL CON NUMERO DE SERIE B Nº0706093(VUELTA), DE LO QUE DOY FE. =====

FIRMADO: JANNE IVETTE LUQUE CARDENAS.- UNA HUELLA DIGITAL.- UNA FIRMA ILEGIBLE.- FIRMÓ EL VEINTISEIS DE JULIO DEL AÑO DOS MIL DIEZ. =====

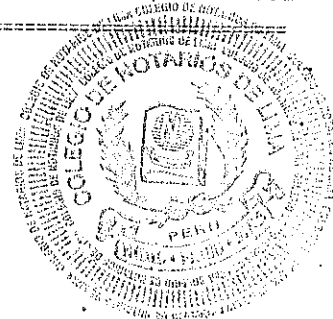
EL PROCESO DE FIRMAS CONCLUYO EL: VEINTISEIS DE JULIO DEL DOS MIL DIEZ. =====

FIRMADO: DR. MARIO GINO BENVENUTO MURGUIA. ABOGADO - NOTARIO DE LIMA. =====

ES TRANSCRIPCION DE LA ESCRITURA PUBLICA QUE CORRE EN EL REGISTRO CON FECHA VEINTISEIS DIAS DEL MES DE JULIO DEL AÑO DOS MIL DIEZ DE FOJAS 004590 A FOJAS 004593(VUELTA), Y A SOLICITUD DE PARTE INTERESADA EXPIDO EL PRESENTE, DE ACUERDO A LA LEY EL QUE RUBRICO EN CADA UNA DE SUS HOJAS, SELLO, SIGNO Y FIRMO EN LIMA, VEINTISEIS DE JULIO DEL AÑO DOS MIL DIEZ. =====



MARIO GINO BENVENUTO MURGUIA
ABOGADO
NOTARIO DE LIMA



COLEGIO DE NOTARIOS DE LIMA CERTIFICA:

la autenticidad y sellos que anteceden en esta foja
en el (la) Notario(a) de Lima,

Benvenuto Murguía

Nº 116766

Fecha:

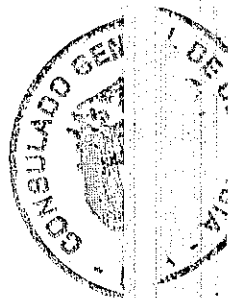
26 JUL 2010

Firma del Notario(a) más no el contenido

Av. Juan de Arona N° 546 - Urb. Cdra. 31 de la Av. Arequipa - San Isidro
Teléfono: 719 - 1667 / 719 - 1668 / 719 - 1669 / Telefax.: 717 - 1031
www.notariabenvenuto.com / e-mail: notario@notariabenvenuto.com

Lina
Lina Gutiérrez Adriaenszén
FISCAL

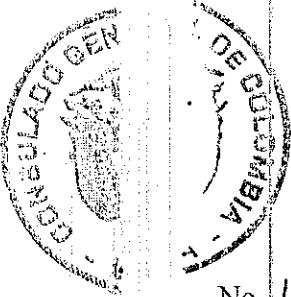
Este carilla está en blanco. Cualquier
texto que se consigne carece de valor



MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
DIRECCIÓN GENERAL DE POLÍTICA CONSULAR
Legalización No. 01594197
Se legaliza la firma que antecede del Sr.(a)
Ricardo A. Laverde
SIN JUZGAR EL CONTENIDO DEL DOCUMENTO

[Signature]
Julia Adela Moreano de Dueñas
Departamento de Legalizaciones
Dirección de Trámites Consulares
LIMA 27 JUL 2010





CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA
Lima – Perú

No. 1793

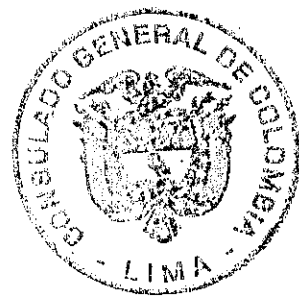
Lima, 02 Agosto 2010

El suscrito Cónsul General Consulares hace constar que el(a) señor (a) JULIA ADELA MOREANO DE DUEÑAS - DIRECION DE TRAMITES CONSULARES. Cuya firma aparece al pie del presente documento desempeñaba las funciones allí indicadas.

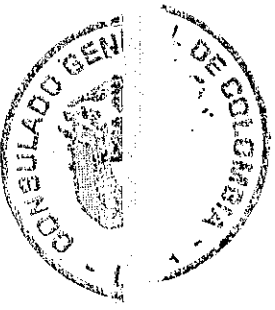
El suscrito Cónsul General no asume responsabilidad alguna por el contenido de este documento.

Pago Impuesto de Timbre US\$10.00
Y derechos consulares US\$15.00

Samir
JAIRO MONTES MORENO
Cónsul General



Dirección: Jorge Basadre 1580 TEL. (511) 4410530- 4410954 Fax: 2213661-4416922-4218029
Sitio Web: <http://www.embajadacolombia.org.pe/html/> - consuladogeneral@embajadacolombia.org.pe
Perú no es miembro del convenio de Apostilla.



NO ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO
2010 AUG 11 A 11:51
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE
RELACIONES
EXTERIORES
264875
JAIRO MONTES
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

RECEIVED
JAN 10 1967
U.S. AIR FORCE

344011

RECEIVED
JAN 10 1967
U.S. AIR FORCE

RECEIVED
JAN 10 1967
U.S. AIR FORCE

344011

RECEIVED
JAN 10 1967
U.S. AIR FORCE

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
6 October 2011 (06.10.2011)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2011/123489 A2

(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01)

bury Road, P.O. Box 368, Ridgefield, Connecticut
06877-0368 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2011/030427

(74) Agents: **MORRIS, Michael P.** et al.; Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc., 900 Ridgebury Road, P.O. Box 368, Ridgefield, CT 06877-0368 (US).

(22) International Filing Date:
30 March 2011 (30.03.2011)

(81) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/319,574 31 March 2010 (31.03.2010) US

(71) Applicant (*for all designated States except US*):
BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH [DE/DE]; Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein (DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **BARRETT, Rachel** [US/US]; Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc., 900 Ridgebury Road, P.O. Box 368, Ridgefield, Connecticut 06877-0368 (US). **BRODEUR, Scott** [US/US]; Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc., 900 Ridgebury Road, P.O. Box 368, Ridgefield, Connecticut 06877-0368 (US). **CANADA, Keith A.** [US/US]; Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc., 900 Ridgebury Road, P.O. Box 368, Ridgefield, Connecticut 06877-0368 (US). **LITZENBURGER, Tobias** [DE/US]; Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc., 900 Ridgebury Road, P.O. Box 368, Ridgefield, Connecticut 06877-0368 (US). **SINGH, Sanjaya** [US/US]; Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc., 900 Ridge-

(84) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: ANTI-CD40 ANTIBODIES

(57) Abstract: The present invention relates to new humanized antagonistic anti-CD40 antibodies and therapeutic and diagnostic methods and compositions for using the same.



WO 2011/123489 A2

09-0529-PCT

ANTI-CD40 ANTIBODIES

FIELD OF THE INVENTION

[0001] This invention generally relates to humanized anti-CD40 antibodies for diagnostic and therapeutic use. More specifically, humanized anti-CD40 antibodies and methods of use for the treatment of various diseases or disorders characterized by cells expressing CD40 are disclosed. Pharmaceutical compositions and kits comprising the humanized anti-CD40 antibody are also disclosed.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] CD40 is a 48kDa type I integral membrane glycoprotein and a member of the tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily. CD40 is expressed on a variety of cell types including normal and neoplastic B cells, interdigitating cells, carcinomas, epithelial cells (e.g. keratinocytes), fibroblasts (e.g. synoviocytes) and platelets. It is also present on monocytes, macrophages, some endothelial cells, and follicular dendritic cells. CD40 is expressed early in B cell ontogeny, appearing on B cell precursors subsequent to the appearance of CD10 and CD19, but prior to expression of CD21, CD23, CD24, and appearance of surface immunoglobulin M (sIgM) (Uckun et al., 1990, Blood 15:2449). CD40 has also been detected on tonsil and bone marrow-derived plasma cells (Pellat-Decounynck et al., 1994, Blood 84:2597).

[0003] The ligand of CD40 is CD40L (also referred to as CD154, gp39, and TRAP), a TNF superfamily member. CD40L is a transmembrane protein expressed predominantly on activated CD4⁺ T cells and a small subset of CD8⁺ T cells (Reviewed by (Van Kooten C. and Banchereau, 2000).

[0004] The interaction of CD40 with CD40L induces both humoral and cell-mediated immune responses. CD40 regulates this ligand-receptor pair to activate B cells and other antigen-presenting cells (APC) including dendritic cells (DCs) (Reviewed by (Toubi and Shoenfeld, 2004); (Kiener, et al., 1995). The function of CD40 on B cells has been studied extensively. Activation of CD40 on B cells induces proliferation, differentiation into antibody secreting cells and isotype switching in germinal centers of

secondary lymphoid organs. *In vitro* studies have shown direct effects of CD40 activation on cytokine production (IL-6, IL-10, TNF- α , LT- α), expression of adhesion molecules and costimulatory receptors (ICAM, CD23, CD80 and CD86), and increased expression of MHC class I, MHC class II, and TAP transporter by B lymphocytes (Liu, et al., 1996). For most of these processes, CD40 acts in concert with either cytokines or other receptor-ligand interactions.

[0005] CD40 signaling on monocytes and DCs results in enhanced survival as well as secretion of cytokines (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α and MIP-1 α). CD40 ligation on these APCs also leads to the up-regulation of costimulatory molecules such as (ICAM-1, LFA-3, CD80, and CD86). Activation of CD40 receptors is one of the critical signals that allow the full maturation of DC into efficient APCs driving T cell activation (Banchereau and Steinman, 1998) (Van Kooten C. and Banchereau, 2000).

[0006] Recent studies in mouse models showed that CD40 signaling on dendritic cells also plays an important role in the generation of TH17 cells which are considered as mediators of autoimmunity in diseases such as arthritis and multiple sclerosis (Iezzi, et al., 2009) (Perona-Wright, et al., 2009).

[0007] The availability of CD40 and CD40L knock-out mice as well as agonistic and antagonistic anti-mouse antibodies offered the possibility to study the role of CD40-CD40L interactions in several disease models. Administration of blocking anti-CD40L has been demonstrated to be beneficial in several models of autoimmunity including spontaneous diseases like lupus nephritis in SNF1 mice or diabetes in NOD mice or in experimentally induced forms of disease like collagen-induced arthritis (CIA) or experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (Toubi and Shoenfeld, 2004). CIA in mice was inhibited by an anti-CD40L mAb which blocked the development of joint inflammation, serum antibody titers to collagen, the infiltration of inflammatory cells into the subsynovial tissue in addition to the erosion of cartilage and bone (Durie, et al., 1993). Both for lupus nephritis and EAE, it was demonstrated that anti-CD40L could also alleviate ongoing disease, confirming the role of CD40-CD40L in the effector phase of the disease (Kalled, et al., 1998); (Howard, et al., 1999).

[0008] The role for CD40–CD40L interactions in the development of EAE was also studied in CD40L-deficient mice that carried a transgenic T cell receptor specific for myelin basic protein. These mice failed to develop EAE after priming with antigen, and CD4+ T cells remained quiescent and produced no INF- γ (Grewal, et al., 1996).

[0009] Furthermore, inhibitory antibodies directed against CD40 showed beneficial effects in inflammatory disease models such as EAE. Lamann and colleagues demonstrated that the antagonistic mouse anti-human CD40 mAb mu5D12 and a chimeric version of this mAb effectively prevented clinical expression of chronic demyelinating EAE in outbred marmoset monkeys (Laman, et al., 2002); (Boon, et al., 2001). A follow-up study showed that therapeutic treatment with the chimeric anti-human CD40 antibody reduces MRI-detectable inflammation and delays enlargement of pre-existing brain lesions in the marmoset EAE model (Hart, et al., 2005).

[0010] Anti-CD40 antibodies with agonistic activity were tested in mouse models of arthritis with some conflicting results. As expected for an immunostimulatory agent, the agonistic anti-mouse CD40 mAb FGK45 was shown to exacerbate disease in the DBA/1 mouse model of CIA (Tellander, et al., 2000). However, in another chronic CIA model FGK45, and another agonistic anti-mouse CD40 mAb, 3/23, both exhibited positive therapeutic effects (Mauri, et al., 2000). It was postulated by this group that the agonistic antibodies in this therapeutic treatment regimen have a beneficial effect by inducing immune deviation towards a Th2 response with decreased levels of IFN- γ and increased levels of IL-4 and IL-10 (Mauri, et al., 2000).

[0011] The prevention of transplant rejection by blocking CD40/CD154 interactions has also been documented. The use of ch5D12, a chimeric anti-CD40 antagonist, in renal allograft studies in rhesus monkeys indicates that antagonism of CD40 is sufficient for disease modification and lengthening mean survival times past 100 days. When ch5D12 was combined with an anti-CD86 antibody and given only at the initiation of the allograft studies followed by prolonged treatment with cyclosporine, mean survival times greater than 4 years were achieved, indicating this combination can potentially induce tolerance (Haanstra, et al., 2005).

[0012] Thus, there are ample preclinical studies that provide evidence for the crucial role of the CD40-CD40L dyad in driving an efficient T cell-dependent immune response. Blocking of CD40 signaling is therefore recognized as a suitable and needed therapeutic strategy to suppress a pathogenic autoimmune response in diseases such as RA, multiple sclerosis or psoriasis. However, to date, there are no CD40 antibodies that have been approved for therapeutic intervention of such disorders due to the findings that anti-CD40 antibodies previously in development were shown to have significant side effects. Thus, there remains a significant need for therapeutic agents that can be used to intervene in the action of the CD40-CD40L and block CD40 signaling. This need could be addressed by new humanized anti-CD40 antibodies that specifically bind CD40 and which show the antigen binding specificity, affinity, and pharmacokinetic and pharmacodynamic properties that allow use thereof in therapeutic intervention of CD40 based disorders.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

[0013] The present invention provides a humanized monoclonal antibody wherein said antibody specifically binds to human CD40 having an antagonistic activity IC₅₀ of less than 1nM and has no agonism up to 100 µg/ml in B cell proliferation and wherein said antibody is further characterized in that the antibody has an in vivo half life in non-human primates that is at least 10 days.

[0014] The humanized monoclonal antibody may be further characterized in that the antibody has a half-life in cynomolgus monkeys of greater than 8 days at a dose of less than 30 mg/kg.

[0015] In exemplary embodiments, the antibody of the invention comprises a heavy chain sequence selected from the group consisting of any of SEQ ID NO:1 to SEQ ID NO:4 and a light chain sequence selected from the group consisting of any of SEQ ID NO:5 to SEQ ID NO:8.

[0016] In other embodiments, the antibody is a humanized antibody or antigen binding fragment of an antibody having the heavy chain variable region amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 1 to 4, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID

NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO. 50 SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, or SEQ ID NO: 73.

[0017] In other embodiments, the antibody is a humanized antibody or antigen binding fragment of an antibody that comprises a light chain variable domain amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 to SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, or SEQ ID NO:76.

[0018] In specific embodiments, the monoclonal antibody described herein is characterized in that it comprises a heavy chain and a light chain, wherein the heavy chain CDR1 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 9 through SEQ ID NO:11, a heavy chain CDR2 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:12 through SEQ ID NO:15 and a heavy chain CDR3 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:16 through SEQ ID NO:17; and wherein the light chain CDR1 sequence has a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:18 through SEQ ID NO:21, a light chain CDR2 sequence of SEQ ID NO:22 through SEQ ID NO:23 and a light chain CDR3 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:24 through SEQ ID NO:25.

[0019] In specific embodiments, the monoclonal antibody described herein is characterized in that it comprises a heavy chain CDR1 sequence of SEQ ID NO: 10, a heavy chain CDR2 sequence of SEQ ID NO:13 and a heavy chain CDR3 sequence of SEQ ID NO:16; and wherein said antibody comprises a light chain CDR1 sequence of SEQ ID NO:19, a light chain CDR2 sequence of SEQ ID NO:22 and a light chain CDR3 sequence of SEQ ID NO:24.

[0020] In other specific embodiments, the monoclonal antibody described herein is characterized in that it comprises a heavy chain CDR1 sequence of SEQ ID NO: 9, a

heavy chain CDR2 sequence of SEQ ID NO:14 and a heavy chain CDR3 sequence of SEQ ID NO:16; and wherein said antibody comprises a light chain CDR1 sequence of SEQ ID NO:20, a light chain CDR2 sequence of SEQ ID NO:22 and a light chain CDR3 sequence of SEQ ID NO:24.

[0021] In another specific embodiment, the monoclonal antibody described herein is characterized in that it comprises a heavy chain CDR1 sequence of SEQ ID NO: 9, a heavy chain CDR2 sequence of SEQ ID NO:14 and a heavy chain CDR3 sequence of SEQ ID NO:16; and wherein said antibody comprises a light chain CDR1 sequence of SEQ ID NO:20, a light chain CDR2 sequence of SEQ ID NO:22 and a light chain CDR3 sequence of SEQ ID NO:24.

[0022] In another specific embodiment, the monoclonal antibody described herein is characterized in that it comprises a heavy chain CDR1 sequence of SEQ ID NO: 11, a heavy chain CDR2 sequence of SEQ ID NO:15 and a heavy chain CDR3 sequence of SEQ ID NO:17; and wherein said antibody comprises a light chain CDR1 sequence of SEQ ID NO:21, a light chain CDR2 sequence of SEQ ID NO:23 and a light chain CDR3 sequence of SEQ ID NO:25.

[0023] Also described herein are individual sequences for heavy chains of the preferred antibodies of the invention. The invention, for example, relates to an anti-CD40 antibody comprising a heavy chain variable domain sequence of any one of SEQ ID NOs:1 to 4. The anti-CD40 antibody is further characterized as comprising a light chain variable domain sequence of any one of SEQ ID NOs: 5 to SEQ ID NO:8.

[0024] Also contemplated is a humanized antibody or antibody fragment having a heavy chain variable domain and a light chain variable region comprising the amino acid sequences of SEQ ID NO:27 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:28 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:29 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:30 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:32 and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:33 and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:34 and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:35 and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:37 and SEQ ID NO:36, respectively; SEQ ID NO:38 and SEQ ID NO:36, respectively; SEQ ID NO:39 and SEQ ID NO:36, respectively; SEQ ID NO:40 and SEQ ID NO: 36, respectively.

[0025] In another embodiment, the invention relates to a humanized antibody or antibody fragment having a heavy chain variable domain and a light chain variable region comprising the amino acid sequences of SEQ ID NO:27 and SEQ ID NO:26, respectively.

[0026] In another embodiment, the invention relates to a humanized antibody or antibody fragment having a heavy chain variable domain and a light chain variable region comprising the amino acid sequences of SEQ ID NO:28 and SEQ ID NO:26, respectively.

[0027] In another embodiment, the invention relates to a humanized antibody or antibody fragment having a heavy chain variable domain and a light chain variable region comprising the amino acid sequences of SEQ ID NO:29 and SEQ ID NO:26, respectively.

[0028] In another embodiment, the invention relates to a humanized antibody or antibody fragment having a heavy chain variable domain and a light chain variable region comprising the amino acid sequences of SEQ ID NO:30 and SEQ ID NO:26, respectively.

[0029] In another embodiment, the invention relates to a humanized antibody or antibody fragment having a heavy chain variable domain and a light chain variable region comprising the amino acid sequences of SEQ ID NO:32 and SEQ ID NO:31, respectively.

[0030] In another embodiment, the invention relates to a humanized antibody or antibody fragment having a heavy chain variable domain and a light chain variable region comprising the amino acid sequences of SEQ ID NO:33 and SEQ ID NO:31, respectively.

[0031] In another embodiment, the invention relates to a humanized antibody or antibody fragment having a heavy chain variable domain and a light chain variable region comprising the amino acid sequences of SEQ ID NO:34 and SEQ ID NO:31, respectively.

[0032] In another embodiment, the invention relates to a humanized antibody or antibody fragment having a heavy chain variable domain and a light chain variable region comprising the amino acid sequences of SEQ ID NO:35 and SEQ ID NO:31, respectively.

[0033] In another embodiment, the invention relates to a humanized antibody or antibody fragment having a heavy chain variable domain and a light chain variable region comprising the amino acid sequences of SEQ ID NO:37 and SEQ ID NO:36, respectively.

[0034] In another embodiment, the invention relates to a humanized antibody or antibody fragment having a heavy chain variable domain and a light chain variable region comprising the amino acid sequences of SEQ ID NO:38 and SEQ ID NO:36, respectively.

[0035] In another embodiment, the invention relates to a humanized antibody or antibody fragment having a heavy chain variable domain and a light chain variable region comprising the amino acid sequences of SEQ ID NO:39 and SEQ ID NO:36, respectively.

[0036] In another embodiment, the invention relates to a humanized antibody or antibody fragment having a heavy chain variable domain and a light chain variable region comprising the amino acid sequences of SEQ ID NO:40 and SEQ ID NO: 36, respectively,

[0037] Another embodiment relates to an isolated antibody or antigen-binding fragment that specifically binds to human CD40, comprising a humanized heavy chain variable domain comprising a framework region having an amino acid sequence at least 90% identical to the amino acid sequence of the framework region of the human variable domain heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29 or SEQ ID NO:30, and comprising a light chain amino acid sequence at least 90% identical to a corresponding light chain variable domain of SEQ ID NO:26.

[0038] Another embodiment relates to an isolated antibody or antigen-binding fragment that specifically binds to human CD40, comprising a humanized heavy chain

variable domain comprising a framework region having an amino acid sequence at least 90% identical to the amino acid sequence of the framework region of the human variable domain heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34 or SEQ ID NO:35, and comprising a light chain amino acid sequence at least 90% identical to a corresponding light chain variable of SEQ ID NO:31.

[0039] In another aspect, the invention relates to the isolated antibody or antigen-binding fragment described in the embodiment immediately above, wherein the heavy chain amino acid sequence is SEQ ID NO:32; in another embodiment, the heavy chain amino acid sequence is SEQ ID NO:33; in another embodiment, the heavy chain amino acid sequence is SEQ ID NO:34; and in another embodiment, the heavy chain amino acid sequence is SEQ ID NO:35,

[0040] Also contemplated is an isolated antibody or antigen-binding fragment that specifically binds to human CD40, comprising a humanized heavy chain variable domain comprising a framework region having an amino acid sequence at least 90% identical to the amino acid sequence of the framework region of the human variable domain heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO:38; SEQ ID NO:39 or SEQ ID NO: 40, and comprising a light chain amino acid sequence at least 90% identical to a corresponding light chain of SEQ ID NO:36.

[0041] In another aspect, the invention relates to the isolated antibody or antigen-binding fragment described in the embodiment immediately above, wherein the heavy chain amino acid sequence is SEQ ID NO:37; in another embodiment, the heavy chain amino acid sequence is SEQ ID NO:38; in another embodiment, the heavy chain amino acid sequence is SEQ ID NO:39; and in another embodiment, the heavy chain amino acid sequence is SEQ ID NO:40,

[0042] The antibodies of the present invention may be further characterized in that said antibodies fail to stimulate production of cytokines from B cells in that absence of CD40L.

[0043] The antibodies of the present invention may be further characterized in that said antibodies bind to human CD40 in the presence of 50% human serum with a reduction of on rate less than two fold.

[0044] The antibodies of the present invention may be further characterized in that said antibody produces inhibition of IgM and IgG production in a mammal at a concentration of 1 mg/kg.

[0045] The antibodies of the present invention may be used in various therapeutic, prophylactic, diagnostic and other methods. For example, the present invention describes a method of blocking the function of human CD40 in a mammal comprising administering to said mammal a composition comprising an antibody of the invention in an amount sufficient to block a CD40 mediated immune response in said mammal.

[0046] Also contemplated herein is a method of treating or ameliorating graft vs host disease in a mammal comprising administering to said mammal a composition comprising an antibody of the invention in an amount sufficient to decrease one or more of the symptoms of graft vs. host disease in said animal.

[0047] By way of example, the autoimmune or inflammatory disease may include but is not limited to rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, proliferative lupus glomerulonephritis, inflammatory bowel disease (IBD), psoriasis, idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP), Crohn's Disease and systemic lupus erythematosus (SLE), Hashimoto's thyroiditis, primary myxoedema, thyrotoxicosis/Graves disease, pernicious anaemia, autoimmune atrophic gastritis, autoimmune carditis, Addison's disease, premature menopause, type 1-diabetes mellitus, Good pasture's syndrome, myasthenia gravis, autoimmune haemolytic anaemia, idiopathic leucopenia, primary biliary cirrhosis, active chronic hepatitis (HBs Ag negative), cryptogenic cirrhosis, Sjogren's syndrome, dermatomyositis, scleroderma, mixed tissues connective disease, discoid lupus erythematosus, and systemic vasculitis. In exemplary embodiments, the mammal has rheumatoid arthritis.

[0048] The methods of the invention may further comprise administering a second therapeutic agent selected from the group consisting of a TNF-antagonist, a disease-modifying antirheumatic drug, a CTLA4-antagonist, an anti-IL-6 receptor mAb and an anti-CD20 mAb.

[0049] In specific embodiments, the inflammatory disease or autoimmune disease is an inflammatory disease or autoimmune disease that is associated with cells expressing both CD40 and CD20.

[0050] In specific methods the treatment involves administering the antibody composition by a parenteral route of administration.

[0051] In specific methods the treatment involves administering the antibody composition intravenously or subcutaneously.

[0052] Additional methods of the invention comprise inhibiting antibody production by B cells in a human patient comprising administering to said human patient an effective amount of an anti-CD40 antibody of the invention .

[0053] More specifically, the human patient has an inflammatory disease or autoimmune disease that is associated with CD40-expressing cells.

[0054] In exemplary embodiments the human patient is suffering from an autoimmune disease selected from the group consisting of autoimmune or inflammatory disease selected from the group consisting of rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, proliferative lupus glomerulonephritis, inflammatory bowel disease (IBD), psoriasis, idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP), Crohn's Disease and systemic lupus erythematosus (SLE), Hashimoto's thyroiditis, primary myxoedema, thyrotoxicosis/Graves disease, pernicious anaemia, autoimmune atrophic gastritis, autoimmune carditis, Addison's disease, premature menopause, type 1-diabetes mellitus, Good pasture's syndrome, myasthenia gravis, autoimmune haemolytic anaemia, idiopathic leucopenia, primary biliary cirrhosis, active chronic hepatitis (HBs Ag negative), cryptogenic cirrhosis, Sjogren's syndrome, dermatomyositis, scleroderma, mixed tissues connective disease, discoid lupus erythematosus, and systemic vasculitis.

[0055] Another method of the invention relates to inhibiting the growth of cells expressing human CD40 antigen, comprising administering the antibody or antigen-binding fragment of the invention to the cells, which antibody or antigen-binding fragment specifically binds to the human cell surface CD40 antigen, wherein the binding

of the antibody or antigen-binding fragment to the CD40 antigen inhibits the growth or differentiation of the cells.

[0056] Also contemplated is a method of treating a subject having a CD40-associated disorder, comprising administering to the subject the antibody or antigen-binding fragment of the invention, which antibody or antigen-binding fragment specifically binds to human CD40, wherein the binding of the antibody or antigen-binding fragment to CD40 inhibits the growth or differentiation of cells of the CD40-associated disorder. The cells may be but are not limited to B lymphoblastoid cells, pancreatic, lung cells, breast cells, ovarian cells, colon cells, prostate cells, skin cells, head and neck cells, bladder cells, bone cells or kidney cells.

[0057] The treatment method for inhibiting growth or differentiation of cells may be useful in the treatment for chronic lymphocytic leukemia, Burkitt's lymphoma, multiple myeloma, a T cell lymphoma, Non-Hodgkin's Lymphoma, Hodgkin's Disease, Waldenstrom's macroglobulinemia or Kaposi's sarcoma.

[0058] Also contemplated is a method for inducing depletion of peripheral B cells, comprising administering to the cells the antibody or antigen-binding fragment of the invention, which antibody or antigen-binding fragment specifically binds to a human cell surface CD40 antigen, wherein the binding of the antibody or antigen-binding fragment to the CD40 antigen induces depletion of the cells.

[0059] In specific embodiments, the antibody or antigen-binding fragment is administered to a subject having an immune disorder. For example, the immune disorder is rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus.

[0060] Also contemplated is a method of treating rheumatoid arthritis in a subject comprising administering to said subject an antibody of the invention, wherein said antibody is an antagonistic antibody that blocks the function of CD40 in said subject.

[0061] Preferably, the antibody is administered in an amount effective to inhibit B cell differentiation and antibody isotype switching in said subject.

[0062] In other embodiments, the antibody is administered in an amount effective to inhibit cytokine and chemokine production and up-regulation of adhesion molecules

in T-cells and macrophages in said subject. Preferably, the antibody is administered in an amount effective to inhibit activation of dendritic cells in said subject.

[0063] In other embodiments, the method is further characterized in that the antibody is administered in an amount effective to inhibit production of proinflammatory cytokines, chemokines, matrix metalloproteinases, prostaglandins, and down-regulate adhesion molecules in non-immune cells in said subject.

[0064] In specific embodiments, the antibody is administered in combination with a regimen comprising methotrexate administration and/or administration of Enbrel/Humira.

[0065] The subject for receiving the therapy is one that has rheumatoid arthritis and has been non-responsive to methotrexate treatment alone.

[0066] In specific embodiments, the method comprises treating said subject with a regimen comprising methotrexate administration and/or administration of Enbrel/Humira.

[0067] The method of the invention may be further characterized wherein treatment of said subject with said antagonistic anti-CD40 antibody has a superior efficacy to treatment with methotrexate alone, Enbrel alone, a combination of Enbrel+methotrexate.

[0068] The method of the invention may be further characterized wherein treatment of said subject with said antagonistic anti-CD40 antibody has a superior efficacy to treatment with Enbrel +MTX in patients who have had an inadequate response to methotrexate.

[0069] In specific embodiments, the antibody is administered in combination with a regimen comprising an anti-TNF agent.

[0070] In specific embodiments, subject is characterized as one who has rheumatoid arthritis and has been non-responsive to treatment with an anti-TNF agent alone. In such embodiments, the method may comprise treating said subject with a regimen comprising treatment with an anti-TNF agent in combination with said antagonistic anti-CD40 antibody.

[0071] In specific embodiments, the treatment of said subject with said antagonistic anti-CD40 antibody has a superior efficacy to treatment with an anti-TNF agent.

[0072] In still other embodiments, the method is characterized in that the treatment of said subject with said antagonistic anti-CD40 antibody has a superior efficacy to treatment with Orencia or Rituxan in patients who have had an inadequate response to an anti-TNF agent alone.

[0073] The present invention further contemplates a pharmaceutical composition comprising:(i) the antibody or antigen-binding fragment as described herein; and(ii) a pharmaceutically acceptable excipient. In such compositions, the antibody or antigen binding fragment thereof may advantageously be conjugated to a second agent, such as for example, a cytotoxic agent, a PEG-carrier, an enzyme or a marker.

[0074] Also contemplated herein is an isolated polynucleotide encoding a heavy chain variable region amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 1 to 4, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID. NO. 50, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, or SEQ ID NO: 73.

[0075] Also contemplated herein is an isolated polynucleotide encoding a light chain variable region amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 5 to SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, or SEQ ID NO:76.

[0076] The invention further relates to the use of the antibodies described herein for the manufacture of a medicament for blocking the function of human CD40 in a

mammal wherein the medicament blocks a CD40 mediated immune response in said mammal.

[0077] In an embodiment the invention relates to the manufacture of a medicament for treating or ameliorating graft vs host disease in a mammal.

[0078] In exemplary embodiments, the medicament is manufactured for the treatment of an autoimmune or inflammatory disease selected from the group consisting of rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, proliferative lupus glomerulonephritis, inflammatory bowel disease (IBD), psoriasis, idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP), Crohn's Disease and systemic lupus erythematosus (SLE), Hashimoto's thyroiditis, primary myxoedema, thyrotoxicosis/Graves disease, pernicious anaemia, autoimmune atrophic gastritis, autoimmune carditis, Addison's disease, premature menopause, type 1-diabetes mellitus, Good pasture's syndrome, myasthenia gravis, autoimmune haemolytic anaemia, idiopathic leucopenia, primary biliary cirrhosis, active chronic hepatitis (HBs Ag negative), cryptogenic cirrhosis, Sjogren's syndrome, dermatomyositis, scleroderma, mixed tissues connective disease, discoid lupus erythematosus, and systemic vasculitis.

[0079] In some embodiments, the medicament may further comprise a second therapeutic agent selected from the group consisting of a TNF-antagonist, a disease-modifying antirheumatic drug, a CTLA4-antagonist, an anti-IL-6 receptor mAb and an anti-CD20 mAb.

[0080] The medicament may be manufactured for use in a parenteral route of administration. The medicament may be manufactured for use intravenously or subcutaneously.

[0081] Another embodiment contemplates a use of the antibodies described herein for the manufacture of a medicament for the inhibition of antibody production by B cells in a human patient.

[0082] Another embodiment contemplates a use of the antibodies described herein for the manufacture of a medicament for inhibiting the growth and/or differentiation of cells expressing human CD40 antigen.

[0083] Another embodiment contemplates a use of the antibodies described herein for the manufacture of a medicament for the treatment of a subject having a CD40-associated disorder wherein the binding of the antibody or antigen-binding fragment in said medicament to CD40 inhibits the growth or differentiation of cells of the CD40-associated disorder.

[0084] The medicament may be manufactured for use in the treatment of cells of a CD40-associated disorder selected from B lymphoblastoid cells, pancreatic, lung cells, breast cells, ovarian cells, colon cells, prostate cells, skin cells, head and neck cells, bladder cells, bone cells or kidney cells.

[0085] The medicament may be manufactured for use in the treatment of chronic lymphocytic leukemia, Burkitt's lymphoma, multiple myeloma, a T cell lymphoma, Non-Hodgkin's Lymphoma, Hodgkin's Disease, Waldenstrom's macroglobulinemia or Kaposi's sarcoma.

[0086] Another embodiment contemplates a use of antibodies of the invention in the manufacture of a medicament for inducing depletion of peripheral B cells wherein the antibody or antigen-binding fragment of the medicament specifically binds to a human cell surface CD40 antigen, wherein the binding of the antibody or antigen-binding fragment to the CD40 antigen induces depletion of the cells.

[0087] The medicament may be manufactured for use in the treatment of a subject having an immune disorder.

[0088] The medicament may be manufactured for use in the treatment of rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus.

[0089] Another embodiment contemplates a use of antibodies of the invention in the manufacture of a medicament for the treatment of rheumatoid arthritis in a subject.

[0090] The medicament may be manufactured for use in inhibition of B cell differentiation and antibody isotype switching in said subject.

[0091] The medicament may be manufactured for use in inhibition of cytokine and chemokine production and up-regulation of adhesion molecules in T-cells and macrophages in said subject.

[0092] The medicament may be manufactured for use in inhibition of activation of dendritic cells in said subject.

[0093] The medicament may be manufactured for use in inhibition of production of proinflammatory cytokines, chemokines, matrix metalloproteinases, prostaglandins, and down-regulation of adhesion molecules in non-immune cells in said subject.

[0094] In certain embodiments, the medicament is manufactured as a combination medicament to be administered in combination with a regimen comprising methotrexate administration and/or administration of Enbrel/Humira.

[0095] In other embodiments, the medicament is manufactured as a combination medicament and the medicament in addition to comprising the antibodies of the invention further comprises an anti-TNF agent.

BRIEF DESCRIPTION OF SEVERAL VIEWS OF THE DRAWINGS

[0096] Figure 1: A. Binding curves and corresponding EC50 values of humanized antibodies on CD40 transfected HEK-293 cells measured by flow cytometry. B. Comparison of binding of Antibody A, Antibody B and Antibody C to CD40 transfected HEK cells measured by flow cytometry. Representative data for one experiment is shown

[0097] Figure 2: Binding curves and corresponding EC50 values of humanized antibodies on RAMOS cells measured by flow cytometry. Representative data for one experiment is shown.

[0098] Figure 3: Testing of mouse and humanized antibodies for antagonistic activity in a human primary B cell proliferation assay. (A) Representative antibody titration curves and resulting IC50 values is depicted for each mouse precursor antibody. Representative data for one donor is shown. (B) Overlay of inhibition curves depicting antagonism of various humanized anti-CD40 antibodies in comparison to 4D11.

[0099] Figure 4: Summary of the results of testing the humanized antibodies for antagonistic (IC50) and agonistic (SI= stimulation index) activity in a human primary B

cell proliferation assay. Various anti-CD40 antibodies, 4D11, G28.5 and 5D12, are shown for comparison.

[00100] Figure 5: Testing of Antibody B, Antibody A and Antibody C for inhibition of CD40 induced CD86-up-regulation of human whole blood assays. The 4D11 anti-CD40 antibody is shown for comparison. The IgG1 isotype control showed no effects in this assay. Representative data for one donor is shown.

[00101] Figure 6: Summary of the results of testing of Antibody B for inhibition of CD40 induced CD86-up-regulation on human purified B cells and human whole blood. The data at both the (A) IC50 and (B) IC90 points are depicted. The IgG1 isotype control showed no effects in either assay. Data for multiple donors (n=4-5) are summarized in the table

[00102] Figure 7: Testing of Antibody B, Antibody A and Antibody C for inhibition of CD40 induced CD86 up-regulation in cynomolgus monkey whole blood assays. The IgG1 isotype control showed no effect in this assay. Representative data for one donor is shown.

[00103] Figure 8: Plasma concentration time curves for Antibody A (left panel) and Antibody B (right panel) in cynomolgus monkey following administration of 1 and 10 mg/kg of each antibody. The data is the summary of administration into 3 animals for each antibody.

[00104] Figure 9: Change of percentage of CD86-positive B cells from cynomolgus monkeys prior to administration of (Antibody B) and (Antibody A) and at 3 time points after treatment with each antibody. Antibody B (Top panels) and Antibody A were administered to 3 animals each with 1 mg/kg (left panels) or 10 mg/kg (right panels).

[00105] Figure 10: (A) Human IgG and (B) human IgM levels in NSG mice at 2 weeks after injection of 1.25×10^6 human PBMC. Mice were treated with vehicle, an isotype control and antibodies Antibody A, Antibody B and Antibody C at a dose of 1 mg/kg one day before transfer of human PBMC

[00106] Figure 11: Binding of various mouse anti-human CD40 antibodies to human platelets.

[00107] Figure 12: Summary of the results of the binding comparison of Antibody B to the anti-CD40 mAb 4D11 on human B cells and platelets in whole blood

[00108] Figure 13: ADCC activity with wild-type and knock-out IgG1 constructs

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[00109] CD40 mediated signalling is now recognized as being involved in a variety of target disorders. Despite the availability of a variety of preclinical data showing that intervention in these disorders would be therapeutically beneficial, there remains a need for antagonistic anti-CD40 antibodies that can be used in the treatment of autoimmune diseases. The present invention in preferred embodiments relates to humanized antibodies that recognize CD40. In specific embodiments, the sequence of these humanized antibodies has been identified based on the sequences of certain lead mouse antibodies.

[00110] The terms "CD40" and "CD40 surface antigen" refer to an approximately 48 kD glycoprotein expressed on the surface of normal and neoplastic B cells, which acts as a receptor for signals involved in cellular proliferation and differentiation (Ledbetter et al., 1987, J. Immunol. 138:788-785). A cDNA molecule encoding CD40 has been isolated from a library prepared from the Burkitt lymphoma cell line Raji (Stamenkovic et al., 1989, EMBO J. 8:1403).

[00111] As used herein, a cell that endogenously expresses CD40 is any cell characterized by the surface expression of CD40, including, but not limited to, normal and neoplastic B cells, interdigitating cells, basal epithelial cells, carcinoma cells, macrophages, endothelial cells, follicular dendritic cells, tonsil cells, and bone marrow-derived plasma cells. In some embodiments, the CD40 molecule is a human CD40 molecule.

[00112] The antibodies of the invention specifically bind to human recombinant and native CD40. A humanized monoclonal antibody wherein said antibody specifically binds to human CD40 having an antagonistic activity IC₅₀ of less than 1nM and has no agonism up to 100 µg/ml in B cell proliferation and wherein said antibody is further

characterized in that the antibody has an in vivo half life in non-human primates that is at least 10 days.

[00113] Preferably antibody specifically binds to CD40 in CD40-Fc conjugate with an EC₅₀ of less than 1 nM and CD40 in CD40 expressing cells with an EC₅₀ of less than 2.5 nM. The antagonistic properties of the antibody are defined in that it has a B cells or dendritic cell antagonistic activity IC₅₀ of less than 1 nM. The antibody further has superior pharmacokinetic properties having an increased in vivo half life as compared to other anti-CD40 antibodies (e.g., anti-CD40 antibody 4D11).

[00114] As used herein, a cell that expresses CD40 is any cell characterized by the surface expression of CD40, including, but not limited to, normal and neoplastic B cells, interdigitating cells, basal epithelial cells, carcinoma cells, macrophages, endothelial cells, follicular dendritic cells, tonsil cells, and bone marrow-derived plasma cells. In some embodiments, the CD40 molecule is a human CD40 molecule.

[00115] The antibodies of the present invention recognize specific "CD40 antigen epitope" and "CD40 epitope". As used herein these terms refer to a molecule (e.g., a peptide) or a fragment of a molecule capable of immunoreactivity with an anti-CD40 antibody and, for example, include a CD40 antigenic determinant recognized by the any of the antibodies having a heavy chain/light chain sequence combination of light chain SEQ ID NO.26 with any of heavy chain SEQ ID NOs: 27, 28, 29 or 30; or light chain SEQ ID NO: 31 with any of heavy chain SEQ ID NOs 32, 33, 34 or 35; or light chain SEQ ID NO 36 with any of heavy chain SEQ ID NOs 37, 38, 39 or 40. CD40 antigen epitopes can be included in proteins, protein fragments, peptides or the like. The epitopes are most commonly proteins, short oligopeptides, oligopeptide mimics (i.e., organic compounds that mimic antibody binding properties of the CD40 antigen), or combinations thereof.

[00116] The generalized structure of antibodies or immunoglobulin is well known to those of skill in the art, these molecules are heterotetrameric glycoproteins, typically of about 150,000 daltons, composed of two identical light (L) chains and two identical heavy (H) chains. Each light chain is covalently linked to a heavy chain by one disulfide bond to form a heterodimer, and the heterotrimeric molecule is formed through a

covalent disulfide linkage between the two identical heavy chains of the heterodimers. Although the light and heavy chains are linked together by one disulfide bond, the number of disulfide linkages between the two heavy chains varies by immunoglobulin isotype. Each heavy and light chain also has regularly spaced intrachain disulfide bridges. Each heavy chain has at the amino-terminus a variable domain (V_H), followed by three or four constant domains (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} , and C_{H4}), as well as a hinge region between C_{H1} and C_{H2} . Each light chain has two domains, an amino-terminal variable domain (V_L) and a carboxy-terminal constant domain (C_L). The V_L domain associates non-covalently with the V_H domain, whereas the C_L domain is commonly covalently linked to the C_{H1} domain via a disulfide bond. Particular amino acid residues are believed to form an interface between the light and heavy chain variable domains (Chothia et al., 1985, J. Mol. Biol. 186:651-663.)

[00117] Certain domains within the variable domains differ extensively between different antibodies i.e., are "hypervariable." These hypervariable domains contain residues that are directly involved in the binding and specificity of each particular antibody for its specific antigenic determinant. Hypervariability, both in the light chain and the heavy chain variable domains, is concentrated in three segments known as complementarity determining regions (CDRs) or hypervariable loops (HVLs). CDRs are defined by sequence comparison in Kabat et al., 1991, In: Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., whereas HVLs are structurally defined according to the three-dimensional structure of the variable domain, as described by Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917. Where these two methods result in slightly different identifications of a CDR, the structural definition is preferred. As defined by Kabat, CDR-L1 is positioned at about residues 24-34, CDR-L2, at about residues 50-56, and CDR-L3, at about residues 89-97 in the light chain variable domain; CDR-H1 is positioned at about residues 31-35, CDR-H2 at about residues 50-65, and CDR-H3 at about residues 95-102 in the heavy chain variable domain. The CDR1, CDR2, CDR3 of the heavy and light chains therefore define the unique and functional properties specific for a given antibody.

[00118] The three CDRs within each of the heavy and light chains are separated by framework regions (FR), which contain sequences that tend to be less variable. From the amino terminus to the carboxy terminus of the heavy and light chain variable domains, the FRs and CDRs are arranged in the order: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, and FR4. The largely β -sheet configuration of the FRs brings the CDRs within each of the chains into close proximity to each other as well as to the CDRs from the other chain. The resulting conformation contributes to the antigen binding site (see Kabat et al., 1991, NIH Publ. No. 91-3242, Vol. I, pages 647-669), although not all CDR residues are necessarily directly involved in antigen binding.

[00119] FR residues and Ig constant domains are not directly involved in antigen binding, but contribute to antigen binding and/or mediate antibody effector function. Some FR residues are thought to have a significant effect on antigen binding in at least three ways: by noncovalently binding directly to an epitope, by interacting with one or more CDR residues, and by affecting the interface between the heavy and light chains. The constant domains are not directly involved in antigen binding but mediate various Ig effector functions, such as participation of the antibody in antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC), complement dependent cytotoxicity (CDC) and antibody dependent cellular phagocytosis (ADCP).

[00120] The light chains of vertebrate immunoglobulins are assigned to one of two clearly distinct classes, kappa (κ) and lambda (λ), based on the amino acid sequence of the constant domain. By comparison, the heavy chains of mammalian immunoglobulins are assigned to one of five major classes, according to the sequence of the constant domains: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM. IgG and IgA are further divided into subclasses (isotypes), e.g., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, and IgA₂. The heavy chain constant domains that correspond to the different classes of immunoglobulins are called α , δ , ϵ , γ , and μ , respectively. The subunit structures and three-dimensional configurations of the classes of native immunoglobulins are well known.

[00121] The terms, "antibody", "anti-CD40 antibody", "humanized anti-CD40 antibody", and "variant humanized anti-CD40 antibody" are used herein in the broadest sense and specifically encompass monoclonal antibodies (including full length

monoclonal antibodies), polyclonal antibodies, multispecific antibodies (e.g., bispecific antibodies), and antibody fragments such as variable domains and other portions of antibodies that exhibit a desired biological activity, e.g., CD40 binding.

[00122] The term "monoclonal antibody" (mAb) refers to an antibody of a population of substantially homogeneous antibodies; that is, the individual antibodies in that population are identical except for naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic determinant, an "epitope". Therefore, the modifier "monoclonal" is indicative of a substantially homogeneous population of antibodies directed to the identical epitope and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. It should be understood that monoclonal antibodies can be made by any technique or methodology known in the art; including e.g., the hybridoma method (Kohler et al., 1975, Nature 256:495), or recombinant DNA methods known in the art (see, e.g., U.S. Pat. No. 4,816,567), or methods of isolation of monoclonal recombinantly produced using phage antibody libraries, using techniques described in Clackson et al., 1991, Nature 352: 624-628, and Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581-597.

[00123] Chimeric antibodies consist of the heavy and light chain variable regions of an antibody from one species (e.g., a non-human mammal such as a mouse) and the heavy and light chain constant regions of another species (e.g., human) antibody and can be obtained by linking the DNA sequences encoding the variable regions of the antibody from the first species (e.g., mouse) to the DNA sequences for the constant regions of the antibody from the second (e.g. human) species and transforming a host with an expression vector containing the linked sequences to allow it to produce a chimeric antibody. Alternatively, the chimeric antibody also could be one in which one or more regions or domains of the heavy and/or light chain is identical with, homologous to, or a variant of the corresponding sequence in a monoclonal antibody from another immunoglobulin class or isotype, or from a consensus or germline sequence. Chimeric antibodies can include fragments of such antibodies, provided that the antibody fragment exhibits the desired biological activity of its parent antibody, for example

binding to the same epitope (see, e.g., U.S. Pat. No. 4,816,567; and Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855).

[00124] The terms, "antibody fragment", "anti-CD40 antibody fragment", "humanized anti-CD40 antibody fragment", "variant humanized anti-CD40 antibody fragment" refer to a portion of a full length anti-CD40 antibody, in which a variable region or a functional capability is retained, for example, specific CD40 epitope binding. Examples of antibody fragments include, but are not limited to, a Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, scFv and scFv-Fc fragment, a diabody, a linear antibody, a single-chain antibody, a minibody, a diabody formed from antibody fragments, and multispecific antibodies formed from antibody fragments.

[00125] Full length antibodies can be treated with enzymes such as papain or pepsin to generate useful antibody fragments. Papain digestion is used to produce two identical antigen-binding antibody fragments called "Fab" fragments, each with a single antigen-binding site, and a residual "Fc" fragment. The Fab fragment also contains the constant domain of the light chain and the C_{H1} domain of the heavy chain. Pepsin treatment yields a F(ab')₂ fragment that has two antigen-binding sites and is still capable of cross-linking antigen.

[00126] Fab' fragments differ from Fab fragments by the presence of additional residues including one or more cysteines from the antibody hinge region at the C-terminus of the C_{H1} domain. F(ab')₂ antibody fragments are pairs of Fab' fragments linked by cysteine residues in the hinge region. Other chemical couplings of antibody fragments are also known.

[00127] "Fv" fragment is contains a complete antigen-recognition and binding site consisting of a dimer of one heavy and one light chain variable domain in tight, non-covalent association. In this configuration, the three CDRs of each variable domain interact to define an antigen-binding site on the surface of the V_H-V_L dimer. Collectively, the six CDRs confer antigen-binding specificity to the antibody.

[00128] A "single-chain Fv" or "scFv" antibody fragment is a single chain Fv variant comprising the V_H and V_L domains of an antibody where the domains are present in a single polypeptide chain. The single chain Fv is capable of recognizing and binding

antigen. The scFv polypeptide may optionally also contain a polypeptide linker positioned between the V_H and V_L domains in order to facilitate formation of a desired three-dimensional structure for antigen binding by the scFv (see, e.g., Pluckthun, 1994, In The Pharmacology of monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315).

[00129] Other recognized antibody fragments include those that comprise a pair of tandem Fd segments (V_H - C_{H1} - V_H - C_{H1}) to form a pair of antigen binding regions. These "linear antibodies" can be bispecific or monospecific as described in, for example, Zapata et al. 1995, Protein Eng. 8(10):1057-1062.

[00130] A humanized antibody or a humanized antibody fragment is a specific type of chimeric antibody which includes an immunoglobulin amino acid sequence variant, or fragment thereof, which is capable of binding to a predetermined antigen and which, comprises one or more FRs having substantially the amino acid sequence of a human immunoglobulin and one or more CDRs having substantially the amino acid sequence of a non-human immunoglobulin. This non-human amino acid sequence often referred to as an "import" sequence is typically taken from an "import" antibody domain, particularly a variable domain. In general, a humanized antibody includes at least the CDRs or HVLs of a non-human antibody, inserted between the FRs of a human heavy or light chain variable domain. The present invention describes specific humanized anti-CD40 antibodies which contain CDRs derived from the murine monoclonal antibodies shown in Tables 3 and 4 inserted between the FRs of human germline sequence heavy and light chain variable domains. It will be understood that certain murine FR residues may be important to the function of the humanized antibodies and therefore certain of the human germline sequence heavy and light chain variable domains residues are modified to be the same as those of the corresponding murine sequence.

[00131] In another aspect, a humanized anti-CD40 antibody comprises substantially all of at least one, and typically two, variable domains (such as contained, for example, in Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, and Fv fragments) in which all, or substantially all, of the CDRs correspond to those of a non-human immunoglobulin, and specifically herein, all of the CDRs are murine sequences as detailed in Tables 1 through 4 herein

below and all, or substantially all, of the FRs are those of a human immunoglobulin consensus or germline sequence. In another aspect, a humanized anti-CD40 antibody also includes at least a portion of an immunoglobulin Fc region, typically that of a human immunoglobulin. Ordinarily, the antibody will contain both the light chain as well as at least the variable domain of a heavy chain. The antibody also may include one or more of the C_{H1}, hinge, C_{H2}, C_{H3}, and/or C_{H4} regions of the heavy chain, as appropriate.

[00132] A humanized anti-CD40 antibody can be selected from any class of immunoglobulins, including IgM, IgG, IgD, IgA and IgE, and any isotype, including IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ and IgA₂. For example, the constant domain can be a complement fixing constant domain where it is desired that the humanized antibody exhibit cytotoxic activity, and the isotype is typically IgG₁. Where such cytotoxic activity is not desirable, the constant domain may be of another isotype, e.g., IgG₂. An alternative humanized anti-CD40 antibody can comprise sequences from more than one immunoglobulin class or isotype, and selecting particular constant domains to optimize desired effector functions is within the ordinary skill in the art. In specific embodiments, the present invention provides antibodies that are IgG1 antibodies and more particularly, are IgG1 antibodies in which there is a knock-out of effector functions.

[00133] The FRs and CDRs, or HVLs, of a humanized anti-CD40 antibody need not correspond precisely to the parental sequences. For example, one or more residues in the import CDR, or HVL, or the consensus or germline FR sequence may be altered (e.g., mutagenized) by substitution, insertion or deletion such that the resulting amino acid residue is no longer identical to the original residue in the corresponding position in either parental sequence but the antibody nevertheless retains the function of binding to CD40. Such alteration typically will not be extensive and will be conservative alterations. Usually, at least 75% of the humanized antibody residues will correspond to those of the parental consensus or germline FR and import CDR sequences, more often at least 90%, and most frequently greater than 95%, or greater than 98% or greater than 99%.

[00134] Immunoglobulin residues that affect the interface between heavy and light chain variable regions ("the V_L-V_H interface") are those that affect the proximity or

orientation of the two chains with respect to one another. Certain residues that may be involved in interchain interactions include V_L residues 34, 36, 38, 44, 46, 87, 89, 91, 96, and 98 and V_H residues 35, 37, 39, 45, 47, 91, 93, 95, 100, and 103 (utilizing the numbering system set forth in Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987)). U.S. Pat. No. 6,407,213 also discusses that residues such as V_L residues 43 and 85, and V_H residues 43 and 60 also may be involved in this interaction. While these residues are indicated for human IgG only, they are applicable across species. Important antibody residues that are reasonably expected to be involved in interchain interactions are selected for substitution into the consensus sequence.

[00135] The terms "consensus sequence" and "consensus antibody" refer to an amino acid sequence which comprises the most frequently occurring amino acid residue at each location in all immunoglobulins of any particular class, isotype, or subunit structure, e.g., a human immunoglobulin variable domain. The consensus sequence may be based on immunoglobulins of a particular species or of many species. A "consensus" sequence, structure, or antibody is understood to encompass a consensus human sequence as described in certain embodiments, and to refer to an amino acid sequence which comprises the most frequently occurring amino acid residues at each location in all human immunoglobulins of any particular class, isotype, or subunit structure. Thus, the consensus sequence contains an amino acid sequence having at each position an amino acid that is present in one or more known immunoglobulins, but which may not exactly duplicate the entire amino acid sequence of any single immunoglobulin. The variable region consensus sequence is not obtained from any naturally produced antibody or immunoglobulin. Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., and variants thereof. The FRs of heavy and light chain consensus sequences, and variants thereof, provide useful sequences for the preparation of humanized anti-CD40 antibodies. See, for example, U.S. Pat. Nos. 6,037,454 and 6,054,297.

[00136] Human germline sequences are found naturally in human population. A combination of those germline genes generates antibody diversity. Germline antibody

sequences for the light chain of the antibody come from conserved human germline kappa or lambda v-genes and j-genes. Similarly the heavy chain sequences come from germline v-, d- and j-genes (LeFranc, M-P, and LeFranc, G, "The Immunoglobulin Facts Book" Academic Press, 2001).

[00137] As used herein, "variant", "anti-CD40 variant", "humanized anti-CD40 variant", or "variant humanized anti-CD40" each refers to a humanized anti-CD40 antibody having at least a heavy chain variable murine CDR from any of the sequences of SEQ ID NO: 1 through 4 or a light chain murine CDR sequence derived from the murine monoclonal antibody as shown in any of SEQ ID NO:5 through SEQ ID NO:8 and FR sequences derived from human consensus sequences. Variants include those having one or more amino acid changes in one or both light chain or heavy chain variable domains, provided that the amino acid change does not substantially impair binding of the antibody to CD40. Exemplary humanized antibodies produced herein include those designated as Antibody A, Antibody B and Antibody C and the various heavy and light chain sequences of the same are shown in SEQ ID NOs 26 through SEQ ID NO:40.

[00138] An "isolated" antibody is one that has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of the antibody's natural environment are those materials that may interfere with diagnostic or therapeutic uses of the antibody, and can be enzymes, hormones, or other proteinaceous or nonproteinaceous solutes. In one aspect, the antibody will be purified to at least greater than 95% isolation by weight of antibody.

[00139] An isolated antibody includes an antibody in situ within recombinant cells in which it is produced, since at least one component of the antibody's natural environment will not be present. Ordinarily however, an isolated antibody will be prepared by at least one purification step in which the recombinant cellular material is removed.

[00140] The term "antibody performance" refers to factors that contribute to antibody recognition of antigen or the effectiveness of an antibody in vivo. Changes in the amino acid sequence of an antibody can affect antibody properties such as folding,

and can influence physical factors such as initial rate of antibody binding to antigen (k_a), dissociation constant of the antibody from antigen (k_d), affinity constant of the antibody for the antigen (K_d), conformation of the antibody, protein stability, and half life of the antibody.

[00141] The term "epitope tagged" when used herein, refers to an anti-CD40 antibody fused to an "epitope tag". An "epitope tag" is a polypeptide having a sufficient number of amino acids to provide an epitope for antibody production, yet is designed such that it does not interfere with the desired activity of the humanized anti-CD40 antibody. The epitope tag is usually sufficiently unique such that an antibody raised against the epitope tag does not substantially cross-react with other epitopes. Suitable tag polypeptides generally contain at least 6 amino acid residues and usually contain about 8 to 50 amino acid residues, or about 9 to 30 residues. Examples of epitope tags and the antibody that binds the epitope include the flu HA tag polypeptide and its antibody 12CA5 (Field et al., 1988 Mol. Cell. Biol. 8: 2159-2165; c-myc tag and 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 and 9E10 antibodies thereto (Evan et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5(12):3610-3616; and Herpes simplex virus glycoprotein D (gD) tag and its antibody (Paborsky et al. 1990, Protein Engineering 3(6): 547-553). In certain embodiments, the epitope tag is a "salvage receptor binding epitope". As used herein, the term "salvage receptor binding epitope" refers to an epitope of the Fc region of an IgG molecule (such as IgG₁, IgG₂, IgG₃, or IgG₄) that is responsible for increasing the in vivo serum half-life of the IgG molecule.

[00142] In some embodiments, the antibodies of the present invention may be conjugated to a cytotoxic agent. This is any substance that inhibits or prevents the function of cells and/or causes destruction of cells. The term is intended to include radioactive isotopes (such as I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, and Re¹⁸⁶), chemotherapeutic agents, and toxins such as enzymatically active toxins of bacterial, fungal, plant, or animal origin, and fragments thereof. Such cytotoxic agents can be coupled to the humanized antibodies of the present invention using standard procedures, and used, for example, to treat a patient indicated for therapy with the antibody.

[00143] A "chemotherapeutic agent" is a chemical compound useful in the treatment of cancer. There are numerous examples of chemotherapeutic agents that could be conjugated with the therapeutic antibodies of the present invention. Examples of such chemotherapeutic agents include alkylating agents such as thiotepa and cyclophosphamide; alkyl sulfonates such as busulfan, improsulfan, and piposulfan; aziridines such as benzodopa, carboquone, meturedopa, and uredopa; ethylenimines and methylamelamines including altretamine, triethylenemelamine, trietylenephosphoramide, triethylenethiophosphoramide, and trimethylolomelamine; acetogenins (especially bullatacin and bullatacinone); camptothecin (including the synthetic analogue topotecan); bryostatin; callystatin; CC-1065 (including its adozelesin, carzelesin, and bizelesin synthetic analogues); cryptophycins (particularly cryptophycin 1 and cryptophycin 8); dolastatin, auristatins, (including analogues monomethylauristatin E and monomethylauristatin F); duocarmycin (including the synthetic analogues, KW-2189 and CBI-TMI); eleutherobin; pancratiostatins; sarcodictyin; spongistatin; nitrogen mustards such as chlorambucil, chlornaphazine, chlorthophosphamide, estramustine, ifosfamide, mechlorethamine, mechlorethamine oxide hydrochloride, melphalan, novembichin, phenesterine, prednimustine; trofosfamide, uracil mustard; nitrosureas such as carmustine, chlorozotocin, fotemustine, lomustine, nimustine, ranimustine; antibiotics such as the enediyne antibiotics (e.g., calicheamicin, especially calicheamicin γ 11 and calicheamicin ϕ 11, see for example, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186; dynemicin, including dynemicin A; bisphosphonates, such as clodronate; esperamicin; as well as neocarzinostatin chromophore and related chromoprotein enediyne antibiotic chromophores), aclacinomysins, actinomycin, authramycin, azaserine, bleomycins, cactinomycin, carubicin, caminomycin, carzinophilin, chromomycins, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine, doxorubicin (Adriamycin™) (including morpholino-doxorubicin, cyanomorpholino-doxorubicin, 2-pyrrolino-doxorubicin, and deoxydoxorubicin), epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomycin, mitomycins such as mitomycin C, mycophenolic acid, nogalamycin, olivomycins, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; anti-metabolites such as methotrexate and 5-fluorouracil (5-FU); folic acid

analogues such as denopterin, methotrexate, pteropterin, trimetrexate; purine analogs such as fludarabine, 6-mercaptopurine, thiamiprine, thioguanine; pyrimidine analogs such as ancitabine, azacitidine, 6-azauridine, carmofur, cytarabine, dideoxyuridine, doxifluridine, enocitabine, floxuridine; androgens such as calusterone, dromostanolone propionate, epitiostanol, mepitiostane, testolactone; anti-adrenals such as aminoglutethimide, mitotane, trilostane; folic acid replenisher such as frolinic acid; aceglatone; aldophosphamide glycoside; aminolevulinic acid; eniluracil; amsacrine; bestrabucil; bisantrene; edatraxate; defofamine; democolcine; diaziquone; elfomithine; elliptinium acetate; an epothilone; etoglucid; gallium nitrate; hydroxyurea; lentinan; lonidamine; maytansinoids such as maytansine and ansamitocins; mitoguazone, mitoxantrone; mopidamol; nitracrine; pentostatin; phenamet; pirarubicin; losoxantrone; podophyllinic acid; 2-ethylhydrazide; procarbazine; PSK®; razoxane; rhizoxin; sizofuran; spirogermanium; tenuazonic acid; triaziquone; 2,2',2''-trichlorotriethylamine; trichothecenes (especially T-2 toxin, verracurin A, roridin A and anguidine); urethan; vindesine; dacarbazine; mannomustine; mitabronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosine; arabinoside ("Ara-C"); cyclophosphamide; thiotepa; taxoids, e.g., paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) and doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); chlorambucil; gemcitabine (Gemzar™); 6-thioguanine; mercaptopurine; methotrexate; platinum analogs such as cisplatin and carboplatin; vinblastine; platinum; etoposide (VP-16); ifosfamide; mitoxantrone; vincristine; vinorelbine Navelbine™); novantrone; teniposide; edatrexate; daunomycin; aminopterin; xeloda; ibandronate; CPT-11; topoisomerase inhibitor RFS 2000; difluoromethylornithine (DMFO); retinoids such as retinoic acid; capecitabine; and pharmaceutically acceptable salts, acids, or derivatives of any of the above. Also included in this definition are anti-hormonal agents that act to regulate or inhibit hormone action on tumors such as anti-estrogens and selective estrogen receptor modulators (SERMs), including, for example, tamoxifen (including Nolvadex™), raloxifene, droloxifene, 4-hydroxytamoxifen, trioxifene, keoxifene, LY117018, onapristone, and toremifene (Fareston™); aromatase inhibitors that inhibit the enzyme aromatase, which regulates estrogen production in the adrenal glands, such as, for example, 4(5)-imidazoles, aminoglutethimide, megestrol acetate (Megace™),

exemestane, formestane, fadrozole, vorozole (Rivisor™), letrozole (Femara™), and anastrozole (Arimidex™); and anti-androgens such as flutamide, nilutamide, bicalutamide, leuprolide, and goserelin; and pharmaceutically acceptable salts, acids, or derivatives of any of the above. Any one or more of these agents may be conjugated to the humanized antibodies of the present invention to provide a useful therapeutic agent for the treatment of various disorders.

[00144] The antibodies also may be conjugated to prodrugs. A "prodrug" is a precursor or derivative form of a pharmaceutically active substance that is less cytotoxic to tumor cells compared to the parent drug and is capable of being enzymatically activated or converted into the more active form. See, for example, Wilman, 1986, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", In Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast and Stella et al., 1985, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery, In: "Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press. Useful prodrugs include, but are not limited to, phosphate-containing prodrugs, thiophosphate-containing prodrugs, sulfate-containing prodrugs peptide-containing prodrugs, D-amino acid-modified prodrugs, glycosylated prodrugs, β -lactam-containing prodrugs, optionally substituted phenoxyacetamide-containing prodrugs, and optionally substituted phenylacetamide-containing prodrugs, 5-fluorocytosine and other 5-fluorouridine prodrugs that can be converted into the more active cytotoxic free drug. Examples of cytotoxic drugs that can be derivatized into a prodrug form include, but are not limited to, those chemotherapeutic agents described above.

[00145] For diagnostic as well as therapeutic monitoring purposes, the antibodies of the invention also may be conjugated to a label, either a label alone or a label and an additional second agent (prodrug, chemotherapeutic agent and the like). A label, as distinguished from the other second agents refers to an agent that is a detectable compound or composition and it may be conjugated directly or indirectly to a humanized antibody of the present invention. The label may itself be detectable (e.g., radioisotope labels or fluorescent labels) or, in the case of an enzymatic label, may catalyze chemical alteration of a substrate compound or composition that is detectable. Labeled humanized anti-CD40 antibody can be prepared and used in various applications including in vitro and in vivo diagnostics.

[00146] The antibodies of the present invention may be formulated as part of a liposomal preparation in order to effect delivery thereof in vivo. A "liposome" is a small vesicle composed of various types of lipids, phospholipids, and/or surfactant. Liposomes are useful for delivery to a mammal of a compound or formulation, such as a humanized anti-CD40 antibody disclosed herein, optionally, coupled to or in combination with one or more pharmaceutically active agents and/or labels. The components of the liposome are commonly arranged in a bilayer formation, similar to the lipid arrangement of biological membranes.

[00147] Certain aspects of the present invention related to isolated nucleic acids that encode one or more domains of the humanized antibodies of the present invention. An "isolated" nucleic acid molecule is a nucleic acid molecule that is identified and separated from at least one contaminant nucleic acid molecule with which it is ordinarily associated in the natural source of the antibody nucleic acid. An isolated nucleic acid molecule is distinguished from the nucleic acid molecule as it exists in natural cells.

[00148] In various aspects of the present invention one or more domains of the humanized antibodies will be recombinantly expressed. Such recombinant expression may employ one or more control sequences, i.e., polynucleotide sequences necessary for expression of an operably linked coding sequence in a particular host organism. The control sequences suitable for use in prokaryotic cells include, for example, promoter, operator, and ribosome binding site sequences. Eukaryotic control sequences include, but are not limited to, promoters, polyadenylation signals, and enhancers. These control sequences can be utilized for expression and production of humanized anti-CD40 antibody in prokaryotic and eukaryotic host cells.

[00149] A nucleic acid sequence is "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, a nucleic acid presequence or secretory leader is operably linked to a nucleic acid encoding a polypeptide if it is expressed as a preprotein that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to facilitate translation. Generally, "operably

linked" means that the DNA sequences being linked are contiguous, and, in the case of a secretory leader, contiguous and in reading frame. However, enhancers are optionally contiguous. Linking can be accomplished by ligation at convenient restriction sites. If such sites do not exist, synthetic oligonucleotide adaptors or linkers can be used.

[00150] As used herein, the expressions "cell", "cell line", and "cell culture" are used interchangeably and all such designations include the progeny thereof. Thus, "transformants" and "transformed cells" include the primary subject cell and cultures derived therefrom without regard for the number of transfers.

[00151] The term "mammal" for purposes of treatment refers to any animal classified as a mammal, including humans, domesticated and farm animals, and zoo, sports, or pet animals, such as dogs, horses, cats, cows, and the like. Preferably, the mammal is human.

[00152] A "disorder", as used herein, is any condition that would benefit from treatment with a humanized anti-CD40 antibody described herein. This includes chronic and acute disorders or diseases including those pathological conditions that predispose the mammal to the disorder in question. Non-limiting examples of disorders to be treated herein include cancer, hematological malignancies, benign and malignant tumors, leukemias and lymphoid malignancies and inflammatory, angiogenic, autoimmune and immunologic disorders.

[00153] The terms "cancer" and "cancerous" refer to or describe the physiological condition in mammals that is typically characterized by unregulated cell growth. Examples of cancer include, but are not limited to, carcinoma, lymphoma, blastoma, sarcoma, and leukemia.

[00154] As used herein, the term "CD40-associated disorder" or "CD40-associated disease" refers to a condition in which modification or elimination of cells expressing CD40 is indicated. These include CD40-expressing cells demonstrating abnormal proliferation or CD40-expressing cells that are associated with cancerous or malignant growth. More particular examples of cancers that demonstrate abnormal expression of CD40 antigen include B lymphoblastoid cells, Burkitt's lymphoma, multiple myeloma, T cell lymphomas, Kaposi's sarcoma, osteosarcoma, epidermal and endothelial tumors,

pancreatic, lung, breast, ovarian, colon, prostate, head and neck, skin (melanoma), bladder, and kidney cancers. Such disorders include, but are not limited to, leukemias, lymphomas, including B cell lymphoma and non-Hodgkin's lymphoma, multiple myeloma, Waldenstrom's macroglobulinemia; solid tumors, including sarcomas, such as osteosarcoma, Ewing's sarcoma, malignant melanoma, adenocarcinoma, including ovarian adenocarcinoma, Kaposi's sarcoma/Kaposi's tumor and squamous cell carcinoma.

[00155] A CD40-associated disorder also includes diseases and disorders of the immune system, such as autoimmune disorders and inflammatory disorders. Such conditions include, but are not limited to, rheumatoid arthritis (RA), systemic lupus erythematosus (SLE), scleroderma, Sjogren's syndrome, multiple sclerosis, psoriasis, inflammatory bowel disease (e.g., ulcerative colitis and Crohn's disease), pulmonary inflammation, asthma, and idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP).

[00156] The phrase "arrests the growth of" or "growth inhibitory" when used herein refers to inhibiting growth or proliferation of a cell, especially a neoplastic cell type expressing the CD40 antigen. Thus, growth inhibition, for example, significantly reduces the percentage of neoplastic cells in S phase.

[00157] The term "intravenous infusion" refers to introduction of an agent into the vein of an animal or human patient over a period of time greater than approximately 15 minutes, generally between approximately 30 to 90 minutes.

[00158] The term "intravenous bolus" or "intravenous push" refers to drug administration into a vein of an animal or human such that the body receives the drug in approximately 15 minutes or less, generally 5 minutes or less.

[00159] The term "subcutaneous administration" refers to introduction of an agent under the skin of an animal or human patient, preferable within a pocket between the skin and underlying tissue, by relatively slow, sustained delivery from a drug receptacle. Pinching or drawing the skin up and away from underlying tissue may create the pocket.

[00160] The term "subcutaneous infusion" refers to introduction of a drug under the skin of an animal or human patient, preferably within a pocket between the skin and

underlying tissue, by relatively slow, sustained delivery from a drug receptacle for a period of time including, but not limited to, 30 minutes or less, or 90 minutes or less. Optionally, the infusion may be made by subcutaneous implantation of a drug delivery pump implanted under the skin of the animal or human patient, wherein the pump delivers a predetermined amount of drug for a predetermined period of time, such as 30 minutes, 90 minutes, or a time period spanning the length of the treatment regimen.

[00161] The term "subcutaneous bolus" refers to drug administration beneath the skin of an animal or human patient, where bolus drug delivery is less than approximately 15 minutes; in another aspect, less than 5 minutes, and in still another aspect, less than 60 seconds. In yet even another aspect, administration is within a pocket between the skin and underlying tissue, where the pocket may be created by pinching or drawing the skin up and away from underlying tissue.

[00162] The term "therapeutically effective amount" is used to refer to an amount of an active agent that relieves or ameliorates one or more of the symptoms of the disorder being treated. In doing so it is that amount that has a beneficial patient outcome, for example, a growth arrest effect or causes the deletion of the cell. In one aspect, the therapeutically effective amount has apoptotic activity, or is capable of inducing cell death. In another aspect, the therapeutically effective amount refers to a target serum concentration that has been shown to be effective in, for example, slowing disease progression. Efficacy can be measured in conventional ways, depending on the condition to be treated. For example, in neoplastic diseases or disorders characterized by cells expressing CD40, efficacy can be measured by assessing the time to disease progression, or determining the response rates.

[00163] The terms "treatment" and "therapy" and the like, as used herein, are meant to include therapeutic as well as prophylactic, or suppressive measures for a disease or disorder leading to any clinically desirable or beneficial effect, including but not limited to alleviation or relief of one or more symptoms, regression, slowing or cessation of progression of the disease or disorder. Thus, for example, the term treatment includes the administration of an agent prior to or following the onset of a symptom of a disease or disorder thereby preventing or removing one or more signs of

the disease or disorder. As another example, the term includes the administration of an agent after clinical manifestation of the disease to combat the symptoms of the disease. Further, administration of an agent after onset and after clinical symptoms have developed where administration affects clinical parameters of the disease or disorder, such as the degree of tissue injury or the amount or extent of metastasis, whether or not the treatment leads to amelioration of the disease, comprises "treatment" or "therapy" as used herein. Moreover, as long as the compositions of the invention either alone or in combination with another therapeutic agent alleviate or ameliorate at least one symptom of a disorder being treated as compared to that symptom in the absence of use of the humanized CD40 antibody composition, the result should be considered an effective treatment of the underlying disorder regardless of whether all the symptoms of the disorder are alleviated or not.

[00164] The term "package insert" is used to refer to instructions customarily included in commercial packages of therapeutic products, that contain information about the indications, usage, administration, contraindications and/or warnings concerning the use of such therapeutic products.

[00165] Antibodies

[00166] Described and disclosed herein are humanized anti-CD40 antibodies, and compositions and articles of manufacture comprising one or more humanized anti-CD40 antibody of the present invention. Also described are binding agents that include an antigen-binding fragment of a humanized anti-CD40 antibody. The humanized anti-CD40 antibodies and binding agents can arrest the growth of cells, cause the deletion of cells expressing CD40 or otherwise induce or cause a cytotoxic or cytostatic effect on target cells. The humanized anti-CD40 antibodies and binding agents can be used in the treatment of a variety of diseases or disorders characterized by the proliferation of cells expressing the CD40 surface antigen. A humanized anti-CD40 antibody and a CD40 binding agent each includes at least a portion that specifically recognizes a CD40 epitope (i.e., an antigen-binding fragment).

[00167] In the initial characterization murine antibodies were selected based on CD40 binding characterization.

[00168] From these initial studies, murine antibodies were selected that had the following heavy chain variable regions shown in Table 1 and the light chain variable regions shown in Table 2:

Table 1: CD40 Murine Leads - VH Sequences

2H11	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDYVHWVKQRPEKGLEWIGR IDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSSNTAYLHLSSLTSED TAVYYCTTSY YVGTYGYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO:1)
10F2	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDYVHWVKQRPEKGLEWIGR IDPEDGDTKYDPKFQGKATMTADTSSNTAYLHLSSLTSED TAVYYCTTSY YVGTYGYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO:2)
19B10	EVQLQQSGAELVRPGASVQLSCTASGFNIKDYVHWVKQRPEKGLEWIGR IDPEDGDTKFAPKFQGKATMTADTSSNTVYLHLSSLTSED TAVYYCTTSY YVGTYGYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO:3)
20E2	EVQLVESGGGLVKGPGGSRKLSAASGFTFSDYGMHWVRQAPEKGLEWVAY ISSGNRIYYADTVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDTALYYCARQD GYRYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:4)

TABLE 2: CD40 Murine Leads - VK Sequences

2H11	QIVLTQSPAISASPGEKVTITCSASSSVSYMLWFQQKPGTSPKLWIYST SNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRTFYPYTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO:5)
10F2	QIVLTQSPTIMSASPGEKVIITCSATSSVS YILWFQQKPGTSPKLWIYST SNLASGVPARFSGSGSGASYSLTISRMEAEDAATYYCQQRTFYPYTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO:6)
19B10	QIVLTQSPAISASPGEKVTITCSASSSVSYMLWFQQKPGTSPKLWIYST SNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRTFYPYTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO:7)
20E2	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWHQQKPGQPP KLLIYWTSTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISNLQAEDLAVYYCQNDYTY PLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:8)

[00169] Human framework sequences were selected for each of the mouse leads based on the framework homology, CDR structure, conserved canonical residues, conserved interface packing residues and other parameters.

[00170] The murine heavy chain and light chain CDRs of the various murine antibodies selected antibodies are shown in Table 3 and Table 4, respectively:

Table 3:
HEAVY CHAIN CDR sequences

Construct name	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3
2H11	<u>GFNIK</u> <i>DYYVH</i>	<i>RIDPEDGDSKYAPKFQG</i>	<i>SYVVGTYGY</i>
	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:16
10F2	<u>GFNIK</u> <i>DYYIH</i>	<i>RIDPEDGDTKYDPKFQG</i>	<i>SYVVGTYGY</i>
	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:16
19B10	<u>GFNIK</u> <i>DYYVH</i>	<i>RIDPEDGDTKFAPKFQG</i>	<i>SYVVGTYGY</i>
	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:16
20E2	<u>GFTFS</u> <i>DYGMH</i>	<i>YISSGNRIIYYADTVKG</i>	<i>QDGYRYAMDY</i>
	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:17

The H-CDR1 listed above is using the sequence using the Chothia numbering system (Al-Lazikani *et al.*, (1997) JMB 273,927-948). The Kabats numbering for the sequences is denoted by the bold italicized text and the IMGT numbering is shown by underlined text of the residues in the above table for CDR1 and CDR2. The sequences for the H-CDR3 for each of 2H11, 10F2 and 19B10 is TTSYVVGTYGY (SEQ ID NO:77) and for 20E2 is ARQDGYRYAMDY (SEQ ID NO:78).

Table 4:
LIGHT CHAIN CDR sequences

Construct name	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
2H11	<u>SASSSVSYML</u>	<u>STSNLAS</u>	<u>QQRTFYPYT</u>
	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:24
10F2	<u>SATSSVSYIL</u>	<u>STSNLAS</u>	<u>QQRTFYPYT</u>
	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:24
19B10	<u>SASSSVSYML</u>	<u>STSNLAS</u>	<u>QQRTFYPYT</u>
	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:24
20E2	<u>KSSQSLLNSGNQKNYLT</u>	<u>WTSTRES</u>	<u>QNDYTYPLT</u>
	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:25

Again, the Chothia numbering system is used in Table 4 with the Kabats numbering for the sequences being denoted by the bold, italicized text and the IMGT numbering is shown by underlined text.

[00171] Fabs that showed better or equal binding as compared to the chimeric parent Fab were selected for conversion to IgG. Clones from the 20E2 series were converted to two different IgG formats: a) IgG4DM (double mutant) has two mutations in the Fc / hinge region, Ser228Pro which reduces half-molecule formation and Leu235Glu which further reduces FcγR binding. b) IgG1KO (knock-out of effector functions) has two mutations in the Fc region, Leu234Ala and Leu235Ala, which reduce effector function such as FcγR and complement binding. Both IgG formats are described in the literature. Example 1 describes the humanization of three candidates in further detail. The results of such humanization resulted in humanized antibody sequences, which have the heavy and light chain sequences shown below:

Identity	Sequence	SEQ ID NO:
Antibody A (Light Chain)	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTW</u> <u>HQOKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS</u> <u>SLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGTKVEIKR</u> TVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	26
Antibody A (Heavy Chain, IgG1K0)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTTLVTVSS</u> ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	27
Antibody A (Heavy Chain, IgG1)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTTLVTVSS</u> ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	28
Antibody A (Heavy Chain, IgG4DM)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTTLVTVSS</u> ASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKRVEPKGPPCPAPEFEGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK	29

	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	
Antibody A (Heavy, IgG1KOb)	<u>EVQLVESGGGLVHPGGSRLSCAASGFTTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTLVTVSS</u> ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKCDKHTCPGPCAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	30
Antibody B (Light Chain)	<u>DIVMTQSPDLSAVSLGEKVTINCKSSQSLNLSGNQKNYL</u> <u>TWHQQKPGQPPKLLIYYTSTRESGVDPDRFSGSGSGTDFT</u> <u>LTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGTKVEIKR</u> TVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC	31
Antibody B (Heavy Chain, IgG1KO)	<u>EVQLVESGGGLVHPGGSRLSCAASGFTTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLLTVTVSS</u> ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKCDKHTCPGPCAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	32
Antibody B (Heavy Chain, IgG1)	<u>EVQLVESGGGLVHPGGSRLSCAASGFTTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLLTVTVSS</u> ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKCDKHTCPGPCAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	33
Antibody B (Heavy Chain, IgG4 DM)	<u>EVQLVESGGGLVHPGGSRLSCAASGFTTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLLTVTVSS</u> ASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVN HKPSNTKVDKRVESKYGPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPKPK KDTLMI SRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	34

Antibody B (Heavy Chain, IgG1KOb)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGLTVTVSS</u> ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	35
Antibody C (Light Chain)	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMLWFO</u> <u>QKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTL</u> <u>TISSLQPEDFATYYCQRTFPYTFGGGTKEIKRT</u> VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	36
Antibody C (Heavy Chain, IgG1KO)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQ GKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED TAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGLTVTVSS</u> ASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	37
Antibody C (Heavy Chain, IgG1)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQ GKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED TAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGLTVTVSS</u> ASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	38
Antibody C (Heavy Chain, IgG4 DM)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQ GKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED TAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGLTVTVSS</u> ASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKRVEPKSGPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHN KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	39

Antibody C (Heavy Chain, IgG1KOb)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQ GKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTIGYWGQGLVTVSS</u> ASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR ~~DEL~~ TKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	40

[00172] In some embodiments, the antigen-binding fragment can, for example, block proliferation or otherwise arrest the growth of a cell or cause its depletion, death, or otherwise its deletion, for example, through binding the CD40 surface antigen. For example, in T and B cell malignancies, anti-tumor effects (e.g., growth arrest with or without cell deletion or apoptosis) often result when malignant cells are exposed to stimuli that lead to activation of normal lymphocytes. This activation-induced growth arrest has been observed with signals through either antigen receptors or costimulatory receptors (see, e.g., Ashwell et al., 1987, Science 237:61; Bridges et al., 1987, J. Immunol. 139:4242; Page and Defranco, 1988, J. Immunol. 140:3717; and Beckwith et al., 1990, J. Natl. Cancer Inst. 82:501). CD40 stimulation, as a result of specific binding by either antibody or soluble ligand, inhibits B cell lymphoma growth (see, e.g., Funakoshi et al., 1994, Blood 83:2787-2794). Agents that inhibit malignant cell growth in this way and that are directed against the CD40 surface antigen are examples of appropriate agents.

[00173] CD40 specific agents include an antigen-binding fragment of a humanized anti-CD40 antibody that binds to CD40 (e.g., human CD40 or a variant thereof). The CD40 specific agents and antibodies can be optionally conjugated with or fused to a cytotoxic or chemotherapeutic agent. In aspects where the humanized antibody binds to the CD40 surface antigen and causes depletion of the CD40 expressing cell types, binding is generally characterized by homing to the CD40 surface antigen cell in vivo. Suitable binding agents bind the CD40 antigen with sufficient affinity and/or avidity such that the CD40 specific agent is useful as a therapeutic agent by specifically targeting a cell expressing the antigen.

[00174] In some aspects, the humanized antibody decreases the binding of CD40 ligand to CD40 by at least 45%, by at least 50%, by at least 60% or by at least 75% or at least 80%, or at least 90%, or at least 95%.

[00175] In some embodiments, the humanized anti-CD40 antibodies, including antigen-binding fragments thereof, such as heavy and light chain variable domains, comprise an amino acid sequence of the residues derived from the CDRs Antibody A (heavy chain sequence = SEQ ID NO:27; SEQ ID NO:28; SEQ ID NO:29 or SEQ ID NO:30; light chain sequence = SEQ ID NO:26), Antibody B (heavy chain sequence = SEQ ID NO:32; SEQ ID NO:33; SEQ ID NO:34; or SEQ ID NO:35; light chain sequence = SEQ ID NO:31) and Antibody C (heavy chain sequence = SEQ ID NO:37; SEQ ID NO:38; SEQ ID NO:39 or SEQ ID NO:40; light chain sequence = SEQ ID NO:36;) described herein above and amino acid residues derived from framework regions of a human immunoglobulin. The humanized anti-CD40 antibodies optionally include specific amino acid substitutions in the consensus or germline framework regions.

[00176] The specific substitution of amino acid residues in these framework positions can improve various aspects of antibody performance including binding affinity and/or stability, over that demonstrated in humanized antibodies formed by "direct swap" of CDRs or HVLs into the human germline framework regions, as shown in the examples below.

[00177] In some embodiments, the present invention describes other monoclonal antibodies with heavy chain (VH) sequences of SEQ ID NO:1 through SEQ ID NO:4 and light chain (VL) sequences of SEQ ID NO:5 to SEQ ID NO:8 (see Tables 1 and 2 above). The CDR sequence of these murine antibodies are shown in Tables 3 and 4 placing such CDRs into FRs of the human consensus heavy and light chain variable domains will yield useful humanized antibodies of the present invention.

[00178] In some specific embodiments, the humanized anti-CD40 antibodies disclosed herein comprise at least a heavy or light chain variable domain comprising the CDRs or HVLs of the murine monoclonal antibodies as shown in Tables 1 through 4 above and the FRs of the human germline heavy and light chain variable domains. In exemplary embodiments, the humanized antibodies created herein are: Antibody A,

Antibody B and Antibody C and the various heavy and light chain sequences of the same are shown in SEQ ID NOs 26 through SEQ ID NO:40.

[00179] In specific embodiments, antibodies are contemplated that have a heavy chain sequence of any of SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29 or SEQ ID NO:30 in combination with a light chain sequence of SEQ ID NO:26. Alternative antibodies include those that have a heavy chain sequence of SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34 or SEQ ID NO:35, in combination with a light chain sequence of SEQ ID NO:31. In still additional embodiments, there are provided humanized antibodies that have a heavy chain sequence of SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO:38; SEQ ID NO:39 or SEQ ID NO: 40, in combination with a light chain sequence of SEQ ID NO:36.

[00180] The CDRs of these sequences are shown in Tables 3 and 4. In specific embodiments, it is contemplated that chimerical antibodies with switched CDR regions (i.e., for example switching one or two CDRs of Antibody A with the analogous CDR from Antibody C) between these exemplary immunoglobulins may yield useful antibodies.

[00181] In certain embodiments, the humanized anti-CD40 antibody is an antibody fragment. Various antibody fragments have been generally discussed above and there are techniques that have been developed for the production of antibody fragments. Fragments can be derived via proteolytic digestion of intact antibodies (see, e.g., Morimoto et al., 1992, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117; and Brennan et al., 1985, Science 229:81). Alternatively, the fragments can be produced directly in recombinant host cells. For example, Fab'-SH fragments can be directly recovered from E. coli and chemically coupled to form F(ab')₂ fragments (see, e.g., Carter et al., 1992, Bio/Technology 10:163-167). By another approach, F(ab')₂ fragments can be isolated directly from recombinant host cell culture. Other techniques for the production of antibody fragments will be apparent to the skilled practitioner.

[00182] Certain embodiments include an F(ab')₂ fragment of a humanized anti-CD40 antibody comprising a have a heavy chain sequence of any of SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29 or SEQ ID NO:30 in combination with a light chain

sequence of SEQ ID NO:26. Alternative antibodies include those that have a heavy chain sequence of SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34 or SEQ ID NO:35, in combination with a light chain sequence of SEQ ID NO:31. In still additional embodiments, there are provided humanized antibodies that have a heavy chain sequence of SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO:38; SEQ ID NO:39 or SEQ ID NO: 40, in combination with a light chain sequence of SEQ ID NO:36. Such embodiments can include an intact antibody comprising such an F(ab')₂.

[00183] In some embodiments, the antibody or antibody fragment includes a constant region that mediates effector function. The constant region can provide antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCP) and/or complement-dependent cytotoxicity (CDC) responses against a CD40-expressing target cell. The effector domain(s) can be, for example, an Fc region of an Ig molecule. Typically, the CD40 binding agent recruits and/or activates cytotoxic white blood cells (e.g., natural killer (NK) cells, phagocytotic cells (e.g., macrophages), and/or serum complement components).

[00184] The effector domain of an antibody can be from any suitable vertebrate animal species and isotypes. The isotypes from different animal species differ in the abilities to mediate effector functions. For example, the ability of human immunoglobulin to mediate CDC and ADCC/ADCP is generally in the order of IgM≈IgG₁≈IgG₃>IgG₂>IgG₄ and IgG₁≈IgG₃>IgG₂/IgM/IgG₄, respectively. Murine immunoglobulins mediate CDC and ADCC/ADCP generally in the order of murine IgM≈IgG₃>>IgG_{2b}>IgG_{2a}>>IgG₁ and IgG_{2b}>IgG_{2a}>IgG₁>>IgG₃, respectively. In another example, murine IgG_{2a} mediates ADCC while both murine IgG_{2a} and IgM mediate CDC.

[00185] Antibody Modifications

[00186] The humanized anti-CD40 antibodies and agents can include modifications of the humanized anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof. For example, it may be desirable to modify the antibody with respect to effector function, so as to enhance the effectiveness of the antibody in treating cancer. One such modification is the introduction of cysteine residue(s) into the Fc region, thereby allowing interchain disulfide bond formation in this region. The homodimeric antibody

thus generated can have improved internalization capability and/or increased complement-mediated cell killing and/or antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). See, for example, Caron et al., 1992, J. Exp Med. 176:1191-1195; and Shopes, 1992, J. Immunol. 148:2918-2922. Homodimeric antibodies having enhanced anti-tumor activity can also be prepared using heterobifunctional cross-linkers as described in Wolff et al., 1993, Cancer Research 53: 2560-2565. Alternatively, an antibody can be engineered to contain dual Fc regions, enhancing complement lysis and ADCC capabilities of the antibody. See Stevenson et al., 1989, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230.

[00187] Antibodies with improved ability to support ADCC have been generated by modifying the glycosylation pattern of their Fc region. This is possible since antibody glycosylation at the asparagine residue, N297, in the C_{H2} domain is involved in the interaction between IgG and Fcγ receptors prerequisite to ADCC. Host cell lines have been engineered to express antibodies with altered glycosylation, such as increased bisecting N-acetylglucosamine or reduced fucose. Fucose reduction provides greater enhancement to ADCC activity than does increasing the presence of bisecting N-acetylglucosamine. Moreover, enhancement of ADCC by low fucose antibodies is independent of the FcγRIIIa V/F polymorphism.

[00188] Modifying the amino acid sequence of the Fc region of antibodies is an alternative to glycosylation engineering to enhance ADCC. The binding site on human IgG₁ for Fcγ receptors has been determined by extensive mutational analysis. This led to the generation of humanized IgG₁ antibodies with Fc mutations that increase the binding affinity for FcγRIIIa and enhance ADCC in vitro. Additionally, Fc variants have been obtained with many different permutations of binding properties, e.g., improved binding to specific FcγR receptors with unchanged or diminished binding to other FcγR receptors.

[00189] Another aspect includes immunoconjugates comprising the humanized antibody or fragments thereof conjugated to a cytotoxic agent such as a chemotherapeutic agent, a toxin (e.g., an enzymatically active toxin of bacterial, fungal,

plant, or animal origin, or fragments thereof), or a radioactive isotope (i.e., a radioconjugate).

[00190] Chemotherapeutic agents useful in the generation of such immunoconjugates have been described above. Enzymatically active toxins and fragments thereof that can be used to form useful immunoconjugates include diphtheria A chain, nonbinding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain (from *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, Aleurites fordii proteins, dianthin proteins, Phytolacca americana proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), Momordica charantia inhibitor, curcin, crotin, Saponaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, the tricothecenes, and the like. A variety of radionuclides are available for the production of radioconjugated humanized anti-CD40 antibodies. Examples include ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , and ^{186}Re .

[00191] Conjugates of the humanized anti-CD40 antibody and cytotoxic or chemotherapeutic agent can be made by known methods, using a variety of bifunctional protein coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionate (SPDP), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCL), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as toluene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, a ricin immunotoxin can be prepared as described in Vitetta et al., 1987, Science 238:1098. Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminepentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionucleotide to the antibody. Conjugates also can be formed with a cleavable linker.

[00192] In another embodiment, the antibody may be conjugated to a "receptor" (such as streptavidin) for utilization in tumor pretargeting. In this procedure, the antibody-receptor conjugate is administered to a patient, followed by removal of unbound conjugate from the circulation using a clearing agent and then administration

of a "ligand" that selectively binds the receptor (e.g., avidin), the ligand being conjugated to a cytotoxic agent (e.g., a radionuclide).

[00193] The humanized anti-CD40 antibodies disclosed herein can also be formulated as immunoliposomes. Liposomes containing the antibody are prepared by methods known in the art, such as described in Epstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688; Hwang et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030; and U.S. Pat. Nos. 4,485,045 and 4,544,545. Liposomes having enhanced circulation time are disclosed, for example, in U.S. Pat. No. 5,013,556.

[00194] Particularly useful liposomes can be generated by the reverse phase evaporation method with a lipid composition comprising phosphatidylcholine, cholesterol and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Liposomes are extruded through filters of defined pore size to yield liposomes with the desired diameter. Fab' fragments of an antibody disclosed herein can be conjugated to the liposomes as described in Martin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:286-288 via a disulfide interchange reaction. A chemotherapeutic agent (such as doxorubicin) is optionally contained within the liposome. See, e.g., Gabizon et al., 1989, J. National Cancer Inst. 81(19):1484.

[00195] The antibodies described and disclosed herein can also be used in ADEPT (Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy) procedures by conjugating the antibody to a prodrug-activating enzyme that converts a prodrug (e.g., a peptidyl chemotherapeutic agent), to an active anti-cancer drug. See, for example, WO 81/01145, WO 88/07378, and U.S. Pat. No. 4,975,278. The enzyme component of the immunoconjugate useful for ADEPT is an enzyme capable of acting on a prodrug in such a way so as to convert it into its more active, cytotoxic form. Specific enzymes that are useful in ADEPT include, but are not limited to, alkaline phosphatase for converting phosphate-containing prodrugs into free drugs; arylsulfatase for converting sulfate-containing prodrugs into free drugs; cytosine deaminase for converting non-toxic 5-fluorocytosine into the anti-cancer drug, 5-fluorouracil; proteases, such as serratia protease, thermolysin, subtilisin, carboxypeptidases, and cathepsins (such as cathepsins B and L), for converting peptide-containing prodrugs into free drugs; D-alanylcarboxypeptidases, for converting prodrugs containing D-amino acid substituents;

carbohydrate-cleaving enzymes such as β -galactosidase and neuraminidase for converting glycosylated prodrugs into free drugs; β -lactamase for converting drugs derivatized with β -lactams into free drugs; and penicillin amidases, such as penicillin V amidase or penicillin G amidase, for converting drugs derivatized at their amine nitrogens with phenoxyacetyl or phenylacetyl groups, respectively, into free drugs. Alternatively, antibodies having enzymatic activity ("abzymes") can be used to convert the prodrugs into free active drugs (see, for example, Massey, 1987, Nature 328: 457-458). Antibody-abzyme conjugates can be prepared by known methods for delivery of the abzyme to a tumor cell population, for example, by covalently binding the enzyme to the humanized anti-CD40 antibody/heterobifunctional crosslinking reagents discussed above. Alternatively, fusion proteins comprising at least the antigen binding region of an antibody disclosed herein linked to at least a functionally active portion of an enzyme as described above can be constructed using recombinant DNA techniques (see, e.g., Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608).

[00196] In certain embodiments, it may be desirable to use a humanized anti-CD40 antibody fragment, rather than an intact antibody, to increase tumor penetration, for example. It may be desirable to modify the antibody fragment in order to increase its serum half life. This can be achieved, for example, by incorporation of a salvage receptor binding epitope into the antibody fragment. In one method, the appropriate region of the antibody fragment can be altered (e.g., mutated), or the epitope can be incorporated into a peptide tag that is then fused to the antibody fragment at either end or in the middle, for example, by DNA or peptide synthesis. See, e.g., WO 96/32478.

[00197] In other embodiments, covalent modifications of the humanized anti-CD40 antibody are also included. Covalent modifications include modification of cysteinyl residues, histidyl residues, lysinyl and amino-terminal residues, arginyl residues, tyrosyl residues, carboxyl side groups (aspartyl or glutamyl), glutaminyl and asparaginyl residues, or seryl, or threonyl residues. Another type of covalent modification involves chemically or enzymatically coupling glycosides to the antibody. Such modifications may be made by chemical synthesis or by enzymatic or chemical cleavage of the antibody, if applicable. Other types of covalent modifications of the antibody can be introduced into the molecule by reacting targeted amino acid residues of the antibody

with an organic derivatizing agent that is capable of reacting with selected side chains or the amino- or carboxy-terminal residues.

[00198] Removal of any carbohydrate moieties present on the antibody can be accomplished chemically or enzymatically. Chemical deglycosylation is described by Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 and by Edge et al., 1981, Anal. Biochem., 118:131. Enzymatic cleavage of carbohydrate moieties on antibodies can be achieved by the use of a variety of endo- and exo-glycosidases as described by Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol 138:350.

[00199] Another type of useful covalent modification comprises linking the antibody to one of a variety of nonproteinaceous polymers, e.g., polyethylene glycol, polypropylene glycol, or polyoxyalkylenes, in the manner set forth in one or more of U.S. Pat. No. 4,640,835, U.S. Pat. No. 4,496,689, U.S. Pat. No. 4,301,144, U.S. Pat. No. 4,670,417, U.S. Pat. No. 4,791,192 and U.S. Pat. No. 4,179,337.

[00200] Humanization and Amino Acid Sequence Variants

[00201] Amino acid sequence variants of the anti-CD40 antibody can be prepared by introducing appropriate nucleotide changes into the anti-CD40 antibody DNA, or by peptide synthesis. Such variants include, for example, deletions from, and/or insertions into and/or substitutions of, residues within the amino acid sequences of the anti-CD40 antibodies of the examples herein. Any combination of deletions, insertions, and substitutions is made to arrive at the final construct, provided that the final construct possesses the desired characteristics. The amino acid changes also may alter post-translational processes of the humanized or variant anti-CD40 antibody, such as changing the number or position of glycosylation sites.

[00202] A useful method for identification of certain residues or regions of the anti-CD40 antibody that are preferred locations for mutagenesis is called "alanine scanning mutagenesis," as described by Cunningham and Wells (Science, 244:1081-1085 (1989)). Here, a residue or group of target residues are identified (e.g., charged residues such as arg, asp, his, lys, and glu) and replaced by a neutral or negatively charged amino acid (typically alanine) to affect the interaction of the amino acids with CD40 antigen. Those amino acid locations demonstrating functional sensitivity to the

substitutions then are refined by introducing further or other variants at, or for, the sites of substitution. Thus, while the site for introducing an amino acid sequence variation is predetermined, the nature of the mutation per se need not be predetermined. For example, to analyze the performance of a mutation at a given site, alanine scanning or random mutagenesis is conducted at the target codon or region and the expressed anti-CD40 antibody variants are screened for the desired activity.

[00203] Amino acid sequence insertions include amino- and/or carboxyl-terminal fusions ranging in length from one residue to polypeptides containing a hundred or more residues, as well as intrasequence insertions of single or multiple amino acid residues. Examples of terminal insertions include an anti-CD40 antibody fused to an epitope tag. Other insertional variants of the anti-CD40 antibody molecule include a fusion to the N- or C-terminus of the anti-CD40 antibody of an enzyme or a polypeptide which increases the serum half-life of the antibody.

[00204] Another type of variant is an amino acid substitution variant. These variants have at least one amino acid residue in the anti-CD40 antibody molecule removed and a different residue inserted in its place. The sites of greatest interest for substitutional mutagenesis include the hypervariable regions, but FR alterations are also contemplated. Conservative substitutions are shown in Table 5 under the heading of "preferred substitutions". If such substitutions result in a change in biological activity, then more substantial changes, denominated "exemplary substitutions", or as further described below in reference to amino acid classes, may be introduced and the products screened.

TABLE 5:

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

[00205] It protein chemistry, it is generally accepted that the biological properties of the antibody can be accomplished by selecting substitutions that differ significantly in

their effect on maintaining (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Naturally occurring residues are divided into groups based on common side-chain properties:

[00206] (1) hydrophobic: norleucine, met, ala, val, leu, ile;

[00207] (2) neutral hydrophilic: cys, ser, thr;

[00208] (3) acidic: asp, glu;

[00209] (4) basic: asn, gin, his, lys, arg;

[00210] (5) residues that influence chain orientation: gly, pro; and

[00211] (6) aromatic: trp, tyr, phe.

[00212] Non-conservative substitutions will entail exchanging a member of one of these classes for another class.

[00213] Any cysteine residue not involved in maintaining the proper conformation of the humanized or variant anti-CD40 antibody also may be substituted, generally with serine, to improve the oxidative stability of the molecule, prevent aberrant crosslinking, or provide for established points of conjugation to a cytotoxic or cytostatic compound. Conversely, cysteine bond(s) may be added to the antibody to improve its stability (particularly where the antibody is an antibody fragment such as an Fv fragment).

[00214] A type of substitutional variant involves substituting one or more hypervariable region residues of a parent antibody (e.g., a humanized or human antibody). Generally, the resulting variant(s) selected for further development will have improved biological properties relative to the parent antibody from which they are generated. A convenient way for generating such substitutional variants is affinity maturation using phage display. Briefly, several hypervariable region sites (e.g., 6-7 sites) are mutated to generate all possible amino substitutions at each site. The antibody variants thus generated are displayed in a monovalent fashion from filamentous phage particles as fusions to the gene III product of M13 packaged within each particle. The phage-displayed variants are then screened for their biological

activity (e.g., binding affinity). In order to identify candidate hypervariable region sites for modification, alanine scanning mutagenesis can be performed to identify hypervariable region residues contributing significantly to antigen binding. Alternatively, or in addition, it may be beneficial to analyze a crystal structure of the antigen-antibody complex to identify contact points between the antibody and human CD40. Such contact residues and neighboring residues are candidates for substitution according to the techniques elaborated herein. Once such variants are generated, the panel of variants is subjected to screening as described herein and antibodies with superior properties in one or more relevant assays may be selected for further development.

[00215] Another type of amino acid variant of the antibody alters the original glycosylation pattern of the antibody. By "altering" is meant deleting one or more carbohydrate moieties found in the antibody, and/or adding one or more glycosylation sites that are not present in the antibody.

[00216] In some embodiments, it may be desirable to modify the antibodies of the invention to add glycosylation sites. Glycosylation of antibodies is typically either N-linked or O-linked. N-linked refers to the attachment of the carbohydrate moiety to the side chain of an asparagine residue. The tripeptide sequences asparagine-X-serine and asparagine-X-threonine, where X is any amino acid except proline, are the recognition sequences for enzymatic attachment of the carbohydrate moiety to the asparagine side chain. Thus, the presence of either of these tripeptide sequences in a polypeptide creates a potential glycosylation site. O-linked glycosylation refers to the attachment of one of the sugars N-acetylgalactosamine, galactose, or xylose to a hydroxyamino acid, most commonly serine or threonine, although 5-hydroxyproline or 5-hydroxylysine may also be used. Thus, in order to glycosylate a given protein, e.g., an antibody, the amino acid sequence of the protein is engineered to contain one or more of the above-described tripeptide sequences (for N-linked glycosylation sites). The alteration may also be made by the addition of, or substitution by, one or more serine or threonine residues to the sequence of the original antibody (for O-linked glycosylation sites).

[00217] Nucleic acid molecules encoding amino acid sequence variants of the anti-CD40 antibody are prepared by a variety of methods known in the art. These

methods include, but are not limited to, isolation from a natural source (in the case of naturally occurring amino acid sequence variants) or preparation by oligonucleotide-mediated (or site-directed) mutagenesis, PCR mutagenesis, and cassette mutagenesis of an earlier prepared variant or a non-variant version of the anti-CD40 antibody.

[00218] Polynucleotides, Vectors, Host Cells, and Recombinant Methods

[00219] Other embodiments encompass isolated polynucleotides that comprise a sequence encoding a humanized anti-CD40 antibody, vectors, and host cells comprising the polynucleotides, and recombinant techniques for production of the humanized antibody. The isolated polynucleotides can encode any desired form of the anti-CD40 antibody including, for example, full length monoclonal antibodies, Fab, Fab', F(ab')₂, and Fv fragments, diabodies, linear antibodies, single-chain antibody molecules, and multispecific antibodies formed from antibody fragments.

[00220] Some embodiments include isolated polynucleotides comprising sequences that encode an antibody or antibody fragment having the heavy chain variable region amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 1 to 4, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, or SEQ ID NO: 40. Some embodiments include isolated polynucleotides comprising sequences that encode an antibody or antibody fragment having the light chain variable domain amino acid sequence of SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:31, or SEQ ID NO:36.

[00221] In one aspect, the isolated polynucleotide sequence(s) encodes an antibody or antibody fragment having a heavy chain variable domain and a light chain variable region comprising the amino acid sequences of SEQ ID NO:27 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:28 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:29 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:30 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:32 and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:33 and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:34 and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:35 and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:37 and SEQ ID NO:36, respectively; SEQ ID NO:38 and SEQ ID NO:36, respectively; SEQ ID NO:39 and SEQ ID NO:36, respectively; SEQ ID NO:40 and SEQ ID NO: 36, respectively.

[00222] The polynucleotide(s) that comprise a sequence encoding a humanized anti-CD40 antibody or a fragment or chain thereof can be fused to one or more regulatory or control sequence, as known in the art, and can be contained in suitable expression vectors or host cell as known in the art. Each of the polynucleotide molecules encoding the heavy or light chain variable domains can be independently fused to a polynucleotide sequence encoding a constant domain, such as a human constant domain, enabling the production of intact antibodies. Alternatively, polynucleotides, or portions thereof, can be fused together, providing a template for production of a single chain antibody.

[00223] For recombinant production, a polynucleotide encoding the antibody is inserted into a replicable vector for cloning (amplification of the DNA) or for expression. Many suitable vectors for expressing the recombinant antibody are available. The vector components generally include, but are not limited to, one or more of the following: a signal sequence, an origin of replication, one or more marker genes, an enhancer element, a promoter, and a transcription termination sequence.

[00224] The humanized anti-CD40 antibodies can also be produced as fusion polypeptides, in which the antibody is fused with a heterologous polypeptide, such as a signal sequence or other polypeptide having a specific cleavage site at the amino terminus of the mature protein or polypeptide. The heterologous signal sequence selected is typically one that is recognized and processed (i.e., cleaved by a signal peptidase) by the host cell. For prokaryotic host cells that do not recognize and process the humanized anti-CD40 antibody signal sequence, the signal sequence can be substituted by a prokaryotic signal sequence. The signal sequence can be, for example, alkaline phosphatase, penicillinase, lipoprotein, heat-stable enterotoxin II leaders, and the like. For yeast secretion, the native signal sequence can be substituted, for example, with a leader sequence obtained from yeast invertase alpha-factor (including *Saccharomyces* and *Kluyveromyces* α -factor leaders), acid phosphatase, *C. albicans* glucoamylase, or the signal described in WO90/13646. In mammalian cells, mammalian signal sequences as well as viral secretory leaders, for example, the herpes simplex gD signal, can be used. The DNA for such precursor region is ligated in reading frame to DNA encoding the humanized anti-CD40 antibody.

[00225] Expression and cloning vectors contain a nucleic acid sequence that enables the vector to replicate in one or more selected host cells. Generally, in cloning vectors this sequence is one that enables the vector to replicate independently of the host chromosomal DNA, and includes origins of replication or autonomously replicating sequences. Such sequences are well known for a variety of bacteria, yeast, and viruses. The origin of replication from the plasmid pBR322 is suitable for most Gram-negative bacteria, the 2- μ plasmid origin is suitable for yeast, and various viral origins (SV40, polyoma, adenovirus, VSV, and BPV) are useful for cloning vectors in mammalian cells. Generally, the origin of replication component is not needed for mammalian expression vectors (the SV40 origin may typically be used only because it contains the early promoter).

[00226] Expression and cloning vectors may contain a gene that encodes a selectable marker to facilitate identification of expression. Typical selectable marker genes encode proteins that confer resistance to antibiotics or other toxins, e.g., ampicillin, neomycin, methotrexate, or tetracycline, or alternatively, are complement auxotrophic deficiencies, or in other alternatives supply specific nutrients that are not present in complex media, e.g., the gene encoding D-alanine racemase for Bacilli.

[00227] One example of a selection scheme utilizes a drug to arrest growth of a host cell. Those cells that are successfully transformed with a heterologous gene produce a protein conferring drug resistance and thus survive the selection regimen. Examples of such dominant selection use the drugs neomycin, mycophenolic acid, and hygromycin. Common selectable markers for mammalian cells are those that enable the identification of cells competent to take up a nucleic acid encoding a humanized anti-CD40 antibody, such as DHFR (dihydrofolate reductase), thymidine kinase, metallothionein-I and -II (such as primate metallothionein genes), adenosine deaminase, ornithine decarboxylase, and the like. Cells transformed with the DHFR selection gene are first identified by culturing all of the transformants in a culture medium that contains methotrexate (Mtx), a competitive antagonist of DHFR. An appropriate host cell when wild-type DHFR is employed is the Chinese hamster ovary (CHO) cell line deficient in DHFR activity (e.g., DG44).

[00228] Alternatively, host cells (particularly wild-type hosts that contain endogenous DHFR) transformed or co-transformed with DNA sequences encoding anti-CD40 antibody, wild-type DHFR protein, and another selectable marker such as aminoglycoside 3'-phosphotransferase (APH), can be selected by cell growth in medium containing a selection agent for the selectable marker such as an aminoglycosidic antibiotic, e.g., kanamycin, neomycin, or G418. See, e.g., U.S. Pat. No. 4,965,199.

[00229] Where the recombinant production is performed in a yeast cell as a host cell, the TRP1 gene present in the yeast plasmid YRp7 (Stinchcomb et al., 1979, Nature 282: 39) can be used as a selectable marker. The TRP1 gene provides a selection marker for a mutant strain of yeast lacking the ability to grow in tryptophan, for example, ATCC No. 44076 or PEP4-1 (Jones, 1977, Genetics 85:12). The presence of the trp1 lesion in the yeast host cell genome then provides an effective environment for detecting transformation by growth in the absence of tryptophan. Similarly, Leu2p-deficient yeast strains such as ATCC 20,622 and 38,626 are complemented by known plasmids bearing the LEU2 gene.

[00230] In addition, vectors derived from the 1.6 μ m circular plasmid pKD1 can be used for transformation of *Kluyveromyces* yeasts. Alternatively, an expression system for large-scale production of recombinant calf chymosin was reported for *K. lactis* (Van den Berg, 1990, Bio/Technology 8:135). Stable multi-copy expression vectors for secretion of mature recombinant human serum albumin by industrial strains of *Kluyveromyces* have also been disclosed (Fleer et al., 1991, Bio/Technology 9:968-975).

[00231] Expression and cloning vectors usually contain a promoter that is recognized by the host organism and is operably linked to the nucleic acid molecule encoding an anti-CD40 antibody or polypeptide chain thereof. Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include phoA promoter, β -lactamase and lactose promoter systems, alkaline phosphatase, tryptophan (trp) promoter system, and hybrid promoters such as the tac promoter. Other known bacterial promoters are also suitable. Promoters for use in bacterial systems also will contain a Shine-Dalgarno (S.D.) sequence operably linked to the DNA encoding the humanized anti-CD40 antibody.

[00232] Many eukaryotic promoter sequences are known. Virtually all eukaryotic genes have an AT-rich region located approximately 25 to 30 bases upstream from the site where transcription is initiated. Another sequence found 70 to 80 bases upstream from the start of transcription of many genes is a CNCAAT region where N may be any nucleotide. At the 3' end of most eukaryotic genes is an AATAAA sequence that may be the signal for addition of the poly A tail to the 3' end of the coding sequence. All of these sequences are suitably inserted into eukaryotic expression vectors.

[00233] Examples of suitable promoting sequences for use with yeast hosts include the promoters for 3-phosphoglycerate kinase or other glycolytic enzymes, such as enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hexokinase, pyruvate decarboxylase, phosphofructokinase, glucose-6-phosphate isomerase, 3-phosphoglycerate mutase, pyruvate kinase, triosephosphate isomerase, phosphoglucose isomerase, and glucokinase.

[00234] Inducible promoters have the additional advantage of transcription controlled by growth conditions. These include yeast promoter regions for alcohol dehydrogenase 2, isocytochrome C, acid phosphatase, derivative enzymes associated with nitrogen metabolism, metallothionein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and enzymes responsible for maltose and galactose utilization. Suitable vectors and promoters for use in yeast expression are further described in EP 73,657. Yeast enhancers also are advantageously used with yeast promoters.

[00235] Humanized anti-CD40 antibody transcription from vectors in mammalian host cells is controlled, for example, by promoters obtained from the genomes of viruses such as polyoma virus, fowlpox virus, adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus, a retrovirus, hepatitis-B virus and Simian Virus 40 (SV40), from heterologous mammalian promoters, e.g., the actin promoter or an immunoglobulin promoter, or from heat-shock promoters, provided such promoters are compatible with the host cell systems.

[00236] The early and late promoters of the SV40 virus are conveniently obtained as an SV40 restriction fragment that also contains the SV40 viral origin of replication. The immediate early promoter of the human cytomegalovirus is conveniently obtained

as a HindIII E restriction fragment. A system for expressing DNA in mammalian hosts using the bovine papilloma virus as a vector is disclosed in U.S. Pat. No. 4,419,446. A modification of this system is described in U.S. Pat. No. 4,601,978. See also Reyes et al., 1982, Nature 297:598-601, disclosing expression of human p-interferon cDNA in mouse cells under the control of a thymidine kinase promoter from herpes simplex virus. Alternatively, the rous sarcoma virus long terminal repeat can be used as the promoter.

[00237] Another useful element that can be used in a recombinant expression vector is an enhancer sequence, which is used to increase the transcription of a DNA encoding a humanized anti-CD40 antibody by higher eukaryotes. Many enhancer sequences are now known from mammalian genes (e.g., globin, elastase, albumin, α -fetoprotein, and insulin). Typically, however, an enhancer from a eukaryotic cell virus is used. Examples include the SV40 enhancer on the late side of the replication origin (bp 100-270), the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer on the late side of the replication origin, and adenovirus enhancers. See also Yaniv, 1982, Nature 297:17-18 for a description of enhancing elements for activation of eukaryotic promoters. The enhancer may be spliced into the vector at a position 5' or 3' to the humanized anti-CD40 antibody-encoding sequence, but is preferably located at a site 5' from the promoter.

[00238] Expression vectors used in eukaryotic host cells (yeast, fungi, insect, plant, animal, human, or nucleated cells from other multicellular organisms) can also contain sequences necessary for the termination of transcription and for stabilizing the mRNA. Such sequences are commonly available from the 5' and, occasionally 3', untranslated regions of eukaryotic or viral DNAs or cDNAs. These regions contain nucleotide segments transcribed as polyadenylated fragments in the untranslated portion of the mRNA encoding anti-CD40 antibody. One useful transcription termination component is the bovine growth hormone polyadenylation region. See WO94/11026 and the expression vector disclosed therein. In some embodiments, humanized anti-CD40 antibodies can be expressed using the CHEF system. (See, e.g., U.S. Pat. No. 5,888,809; the disclosure of which is incorporated by reference herein.)

[00239] Suitable host cells for cloning or expressing the DNA in the vectors herein are the prokaryote, yeast, or higher eukaryote cells described above. Suitable prokaryotes for this purpose include eubacteria, such as Gram-negative or Gram-positive organisms, for example, Enterobacteriaceae such as Escherichia, e.g., E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, e.g., Salmonella typhimurium, Serratia, e.g., Serratia marcescans, and Shigella, as well as Bacilli such as B. subtilis and B. licheniformis (e.g., B. licheniformis 41 P disclosed in DD 266,710 published Apr. 12, 1989), Pseudomonas such as P. aeruginosa, and Streptomyces. One preferred E. coli cloning host is E. coli 294 (ATCC 31,446), although other strains such as E. coli B, E. coli X1776 (ATCC 31,537), and E. coli W3110 (ATCC 27,325) are suitable. These examples are illustrative rather than limiting.

[00240] In addition to prokaryotes, eukaryotic microbes such as filamentous fungi or yeast are suitable cloning or expression hosts for humanized anti-CD40 antibody-encoding vectors. Saccharomyces cerevisiae, or common baker's yeast, is the most commonly used among lower eukaryotic host microorganisms. However, a number of other genera, species, and strains are commonly available and useful herein, such as Schizosaccharomyces pombe; Kluyveromyces hosts such as, e.g., K. lactis, K. fragilis (ATCC 12,424), K. bulgaricus (ATCC 16,045), K. wickerhamii (ATCC 24,178), K. waltii (ATCC 56,500), K. drosophilum (ATCC 36,906), K. thermotolerans, and K. marxianus; Yarrowia (EP 402,226); Pichia pastoris (EP 183,070); Candida; Trichoderma reesei (EP 244,234); Neurospora crassa; Schwanniomyces such as Schwanniomyces occidentalis; and filamentous fungi such as, e.g., Neurospora, Penicillium, Tolypocladium, and Aspergillus hosts such as A. nidulans and A. niger.

[00241] Suitable host cells for the expression of glycosylated humanized anti-CD40 antibody are derived from multicellular organisms. Examples of invertebrate cells include plant and insect cells, including, e.g., numerous baculoviral strains and variants and corresponding permissive insect host cells from hosts such as Spodoptera frugiperda (caterpillar), Aedes aegypti (mosquito), Aedes albopictus (mosquito), Drosophila melanogaster (fruitfly), and Bombyx mori (silk worm). A variety of viral strains for transfection are publicly available, e.g., the L-1 variant of Autographa

californica NPV and the Bm-5 strain of *Bombyx mori* NPV, and such viruses may be used, particularly for transfection of *Spodoptera frugiperda* cells.

[00242] Plant cell cultures of cotton, corn, potato, soybean, petunia, tomato, and tobacco can also be utilized as hosts.

[00243] In another aspect, expression of humanized anti-CD40 is carried out in vertebrate cells. The propagation of vertebrate cells in culture (tissue culture) has become routine procedure and techniques are widely available. Examples of useful mammalian host cell lines are monkey kidney CV1 line transformed by SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), human embryonic kidney line (293 or 293 cells subcloned for growth in suspension culture, (Graham et al., 1977, J. Gen Virol. 36: 59), baby hamster kidney cells (BHK, ATCC CCL 10), Chinese hamster ovary cells/-DHFR1 (CHO, Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216; e.g., DG44), mouse sertoli cells (TM4, Mather, 1980, Biol. Reprod. 23:243-251), monkey kidney cells (CV1 ATCC CCL 70), African green monkey kidney cells (VERO-76, ATCC CRL-1587), human cervical carcinoma cells (HELA, ATCC CCL 2), canine kidney cells (MDCK, ATCC CCL 34), buffalo rat liver cells (BRL 3A, ATCC CRL 1442), human lung cells (W138, ATCC CCL 75), human liver cells (Hep G2, HB 8065), mouse mammary tumor (MMT 060562, ATCC CCL51), TR1 cells (Mather et al., 1982, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68), MRC 5 cells, FS4 cells, and human hepatoma line (Hep G2).

[00244] Host cells are transformed with the above-described expression or cloning vectors for humanized anti-CD40 antibody production and cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for inducing promoters, selecting transformants, or amplifying the genes encoding the desired sequences.

[00245] The host cells used to produce a humanized anti-CD40 antibody described herein may be cultured in a variety of media. Commercially available media such as Ham's F10 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo.), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma-Aldrich Co.), RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Co.), and Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma-Aldrich Co.) are suitable for culturing the host cells. In addition, any of the media described in one or more of Ham et al., 1979, Meth. Enz. 58: 44, Barnes et al., 1980, Anal. Biochem. 102: 255, U.S. Pat. No. 4,767,704, U.S. Pat.

No. 4,657,866, U.S. Pat. No. 4,927,762, U.S. Pat. No. 4,560,655, U.S. Pat. No. 5,122,469, WO 90/103430, and WO 87/00195 may be used as culture media for the host cells. Any of these media may be supplemented as necessary with hormones and/or other growth factors (such as insulin, transferrin, or epidermal growth factor), salts (such as sodium chloride, calcium, magnesium, and phosphate), buffers (such as HEPES), nucleotides (such as adenosine and thymidine), antibiotics (such as gentamicin), trace elements (defined as inorganic compounds usually present at final concentrations in the micromolar range), and glucose or an equivalent energy source. Other supplements may also be included at appropriate concentrations that would be known to those skilled in the art. The culture conditions, such as temperature, pH, and the like, are those previously used with the host cell selected for expression, and will be apparent to the ordinarily skilled artisan.

[00246] When using recombinant techniques, the antibody can be produced intracellularly, in the periplasmic space, or directly secreted into the medium. If the antibody is produced intracellularly, the cells may be disrupted to release protein as a first step. Particulate debris, either host cells or lysed fragments, can be removed, for example, by centrifugation or ultrafiltration. Carter et al., 1992, *Bio/Technology* 10:163-167 describes a procedure for isolating antibodies that are secreted to the periplasmic space of *E. coli*. Briefly, cell paste is thawed in the presence of sodium acetate (pH 3.5), EDTA, and phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) over about 30 minutes. Cell debris can be removed by centrifugation. Where the antibody is secreted into the medium, supernatants from such expression systems are generally first concentrated using a commercially available protein concentration filter, for example, an Amicon or Millipore Pellicon ultrafiltration unit. A protease inhibitor such as PMSF may be included in any of the foregoing steps to inhibit proteolysis and antibiotics may be included to prevent the growth of adventitious contaminants. A variety of methods can be used to isolate the antibody from the host cell.

[00247] The antibody composition prepared from the cells can be purified using, for example, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, and affinity chromatography, with affinity chromatography being a typical purification technique. The suitability of protein A as an affinity ligand depends on the species and isotype of any

immunoglobulin Fc domain that is present in the antibody. Protein A can be used to purify antibodies that are based on human gamma1, gamma2, or gamma4 heavy chains (see, e.g., Lindmark et al., 1983 J. Immunol. Meth. 62:1-13). Protein G is recommended for all mouse isotypes and for human gamma3 (see, e.g., Guss et al., 1986 EMBO J. 5:1567-1575). A matrix to which an affinity ligand is attached is most often agarose, but other matrices are available. Mechanically stable matrices such as controlled pore glass or poly(styrenedivinyl)benzene allow for faster flow rates and shorter processing times than can be achieved with agarose. Where the antibody comprises a C_{H3} domain, the Bakerbond ABX™ resin (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) is useful for purification. Other techniques for protein purification such as fractionation on an ion-exchange column, ethanol precipitation, reverse phase HPLC, chromatography on silica, chromatography on heparin SEPHAROSE™ chromatography on an anion or cation exchange resin (such as a polyaspartic acid column), chromatofocusing, SDS-PAGE, and ammonium sulfate precipitation are also available depending on the antibody to be recovered.

[00248] Following any preliminary purification step(s), the mixture comprising the antibody of interest and contaminants may be subjected to low pH hydrophobic interaction chromatography using an elution buffer at a pH between about 2.5-4.5, typically performed at low salt concentrations (e.g., from about 0-0.25M salt).

[00249] Also included are nucleic acids that hybridize under low, moderate, and high stringency conditions, as defined herein, to all or a portion (e.g., the portion encoding the variable region) of the nucleotide sequence represented by isolated polynucleotide sequence(s) that encode an antibody or antibody fragment having a heavy chain variable domain and a light chain variable region comprising the amino acid sequences of SEQ ID NO:27 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:28 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:29 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:30 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:32 and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:33 and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:34 and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:35 and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:37 and SEQ ID NO:36, respectively; SEQ ID NO:38 and SEQ ID NO:36, respectively; SEQ ID NO:39 and SEQ ID NO:36, respectively; SEQ ID NO:40 and SEQ ID NO: 36, respectively. The

hybridizing portion of the hybridizing nucleic acid is typically at least 15 (e.g., 20, 25, 30 or 50) nucleotides in length. The hybridizing portion of the hybridizing nucleic acid is at least 80%, e.g., at least 90%, at least 95%, or at least 98%, identical to the sequence of a portion or all of a nucleic acid encoding an anti-CD40 polypeptide (e.g., a heavy chain or light chain variable region), or its complement. Hybridizing nucleic acids of the type described herein can be used, for example, as a cloning probe, a primer, e.g., a PCR primer, or a diagnostic probe.

[00250] Some embodiments include isolated polynucleotides including sequences that encode an antibody or antibody fragment having the heavy chain variable region amino acid sequence that is at least 80%, at least 90%, at least 95%, at least 98%, or at least 99% identical to the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 1 to 4, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, or SEQ ID NO: 40.. Some embodiments include isolated polynucleotides including sequences that encode an antibody or antibody fragment having the light chain variable domain amino acid sequence that is at least 80%, at least 90%, at least 95%, at least 98%, or at least 99% identical to the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 5 to 8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:31, or SEQ ID NO:36.

[00251] In one aspect, the isolated polynucleotide sequence(s) encodes an antibody or antibody fragment having a heavy chain variable domain and a light chain variable region, each including an amino acid sequence that is at least 80%, at least 90%, at least 95%, at least 98%, or at least 99% identical to the amino acid sequence of an antibody or antibody fragment having a heavy chain variable domain and a light chain variable region comprising the amino acid sequences of SEQ ID NO:27 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:28 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:29 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:30 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:32 and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:33 and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:34 and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:35 and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:37 and SEQ ID NO:36, respectively; SEQ ID NO:38 and SEQ ID NO:36, respectively; SEQ ID NO:39 and SEQ ID NO:36, respectively; SEQ ID NO:40 and SEQ ID NO: 36, respectively.

[00252] In another aspect, the invention relates to a polynucleotide in the embodiment described immediately above, wherein the heavy chain variable domain and the light chain variable region of the encoded antibody or antibody fragment includes an amino acid sequence that is at least 95%, at least 98%, or at least 99% identical to the amino acid sequence of an antibody or antibody fragment having a heavy chain variable domain and a light chain variable region comprising the amino acid sequences of, in one embodiment, SEQ ID NO:27 and SEQ ID NO:26, respectively; in another embodiment, SEQ ID NO:28 and SEQ ID NO:26, respectively; in another embodiment, SEQ ID NO:29 and SEQ ID NO:26, respectively; in another embodiment, SEQ ID NO:30 and SEQ ID NO:26, respectively; in another embodiment, SEQ ID NO:32 and SEQ ID NO:31, respectively; in another embodiment, SEQ ID NO:33 and SEQ ID NO:31, respectively; in another embodiment, SEQ ID NO:34 and SEQ ID NO:31, respectively; in another embodiment, SEQ ID NO:35 and SEQ ID NO:31, respectively; in another embodiment, SEQ ID NO:37 and SEQ ID NO:36, respectively; in another embodiment, SEQ ID NO:38 and SEQ ID NO:36, respectively; in another embodiment, SEQ ID NO:39 and SEQ ID NO:36, respectively; and in another embodiment, SEQ ID NO:40 and SEQ ID NO: 36, respectively.

[00253] As used herein, the terms "identical" or "percent identity," in the context of two or more nucleic acids or polypeptide sequences, refer to two or more sequences or subsequences that are the same or have a specified percentage of nucleotides or amino acid residues that are the same, when compared and aligned for maximum correspondence. To determine the percent identity, the sequences are aligned for optimal comparison purposes (e.g., gaps can be introduced in the sequence of a first amino acid or nucleic acid sequence for optimal alignment with a second amino or nucleic acid sequence). The amino acid residues or nucleotides at corresponding amino acid positions or nucleotide positions are then compared. When a position in the first sequence is occupied by the same amino acid residue or nucleotide as the corresponding position in the second sequence, then the molecules are identical at that position. The percent identity between the two sequences is a function of the number of identical positions shared by the sequences (i.e., % identity=# of identical positions/total # of positions (e.g., overlapping positions)x100). In some embodiments, the two

sequences that are compared are the same length after gaps are introduced within the sequences, as appropriate (e.g., excluding additional sequence extending beyond the sequences being compared). For example, when variable region sequences are compared, the leader and/or constant domain sequences are not considered. For sequence comparisons between two sequences, a "corresponding" CDR refers to a CDR in the same location in both sequences (e.g., CDR-H1 of each sequence).

[00254] The determination of percent identity or percent similarity between two sequences can be accomplished using a mathematical algorithm. A preferred, non-limiting example of a mathematical algorithm utilized for the comparison of two sequences is the algorithm of Karlin and Altschul, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268, modified as in Karlin and Altschul, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Such an algorithm is incorporated into the NBLAST and XBLAST programs of Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410. BLAST nucleotide searches can be performed with the NBLAST program, score=100, wordlength=12, to obtain nucleotide sequences homologous to a nucleic acid encoding a protein of interest. BLAST protein searches can be performed with the XBLAST program, score=50, wordlength=3, to obtain amino acid sequences homologous to protein of interest. To obtain gapped alignments for comparison purposes, Gapped BLAST can be utilized as described in Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. Alternatively, PSI-Blast can be used to perform an iterated search which detects distant relationships between molecules (Id.). When utilizing BLAST, Gapped BLAST, and PSI-Blast programs, the default parameters of the respective programs (e.g., XBLAST and NBLAST) can be used. Another preferred, non-limiting example of a mathematical algorithm utilized for the comparison of sequences is the algorithm of Myers and Miller, CABIOS (1989). Such an algorithm is incorporated into the ALIGN program (version 2.0) which is part of the GCG sequence alignment software package. When utilizing the ALIGN program for comparing amino acid sequences, a PAM120 weight residue table, a gap length penalty of 12, and a gap penalty of 4 can be used. Additional algorithms for sequence analysis are known in the art and include ADVANCE and ADAM as described in Torellis and Robotti, 1994, *Comput. Appl. Biosci.* 10:3-5; and FASTA described in Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-8. Within FASTA, ktup

is a control option that sets the sensitivity and speed of the search. If ktup=2, similar regions in the two sequences being compared are found by looking at pairs of aligned residues; if ktup=1, single aligned amino acids are examined. ktup can be set to 2 or 1 for protein sequences, or from 1 to 6 for DNA sequences. The default if ktup is not specified is 2 for proteins and 6 for DNA. Alternatively, protein sequence alignment may be carried out using the CLUSTAL W algorithm, as described by Higgins et al., 1996, Methods Enzymol. 266:383-402.

[00255] Non-Therapeutic Uses

[00256] The antibodies described herein are useful as affinity purification agents. In this process, the antibodies are immobilized on a solid phase such as a Protein A resin, using methods well known in the art. The immobilized antibody is contacted with a sample containing the CD40 protein (or fragment thereof) to be purified, and thereafter the support is washed with a suitable solvent that will remove substantially all the material in the sample except the CD40 protein, which is bound to the immobilized antibody. Finally, the support is washed with another suitable solvent that will release the CD40 protein from the antibody.

[00257] Humanized anti-CD40 antibodies are also useful in diagnostic assays to detect and/or quantify CD40 protein, for example, detecting CD40 expression in specific cells, tissues, or serum.

[00258] It will be advantageous in some embodiments, for example, for diagnostic purposes to label the antibody with a detectable moiety. Numerous detectable labels are available, including radioisotopes, fluorescent labels, enzyme substrate labels and the like. The label may be indirectly conjugated with the antibody using various known techniques. For example, the antibody can be conjugated with biotin and any of the three broad categories of labels mentioned above can be conjugated with avidin, or vice versa. Biotin binds selectively to avidin and thus, the label can be conjugated with the antibody in this indirect manner. Alternatively, to achieve indirect conjugation of the label with the antibody, the antibody can be conjugated with a small hapten (such as digoxin) and one of the different types of labels

mentioned above is conjugated with an anti-hapten antibody (e.g., anti-digoxin antibody). Thus, indirect conjugation of the label with the antibody can be achieved.

[00259] Exemplary radioisotopes labels include ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , and ^{131}I . The antibody can be labeled with the radioisotope, using the techniques described in, for example, Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, 1991, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. Radioactivity can be measured, for example, by scintillation counting.

[00260] Exemplary fluorescent labels include labels derived from rare earth chelates (europium chelates) or fluorescein and its derivatives, rhodamine and its derivatives, dansyl, Lissamine, phycoerythrin, and Texas Red are available. The fluorescent labels can be conjugated to the antibody via known techniques, such as those disclosed in Current Protocols in Immunology, supra, for example. Fluorescence can be quantified using a fluorimeter.

[00261] There are various well-characterized enzyme-substrate labels known in the art (see, e.g., U.S. Pat. No. 4,275,149 for a review). The enzyme generally catalyzes a chemical alteration of the chromogenic substrate that can be measured using various techniques. For example, alteration may be a color change in a substrate that can be measured spectrophotometrically. Alternatively, the enzyme may alter the fluorescence or chemiluminescence of the substrate. Techniques for quantifying a change in fluorescence are described above. The chemiluminescent substrate becomes electronically excited by a chemical reaction and may then emit light that can be measured, using a chemiluminometer, for example, or donates energy to a fluorescent acceptor.

[00262] Examples of enzymatic labels include luciferases such as firefly luciferase and bacterial luciferase (U.S. Pat. No. 4,737,456), luciferin, 2,3-dihydrophthalazinediones, malate dehydrogenase, urease, peroxidase such as horseradish peroxidase (HRPO), alkaline phosphatase, β -galactosidase, glucoamylase, lysozyme, saccharide oxidases (such as glucose oxidase, galactose oxidase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase), heterocyclic oxidases (such as uricase and xanthine oxidase), lactoperoxidase, microperoxidase, and the like. Techniques for

conjugating enzymes to antibodies are described, for example, in O'Sullivan et al., 1981, Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzym. (J. Langone & H. Van Vunakis, eds.), Academic press, N.Y., 73: 147-166.

[00263] Examples of enzyme-substrate combinations include, for example: Horseradish peroxidase (HRPO) with hydrogen peroxidase as a substrate, wherein the hydrogen peroxidase oxidizes a dye precursor such as orthophenylene diamine (OPD) or 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine hydrochloride (TMB); alkaline phosphatase (AP) with para-Nitrophenyl phosphate as chromogenic substrate; and β -D-galactosidase (β -D-Gal) with a chromogenic substrate such as p-nitrophenyl- β -D-galactosidase or fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl- β -D-galactosidase.

[00264] Numerous other enzyme-substrate combinations are available to those skilled in the art. For a general review of these, see U.S. Pat. No. 4,275,149 and U.S. Pat. No. 4,318,980.

[00265] In another embodiment, the humanized anti-CD40 antibody is used unlabeled and detected with a labeled antibody that binds the humanized anti-CD40 antibody.

[00266] The antibodies described herein may be employed in any known assay method, such as competitive binding assays, direct and indirect sandwich assays, and immunoprecipitation assays. See, e.g., Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

[00267] Diagnostic Kits

[00268] A humanized anti-CD40 antibody can be used in a diagnostic kit, i.e., a packaged combination of reagents in predetermined amounts with instructions for performing the diagnostic assay. Where the antibody is labeled with an enzyme, the kit may include substrates and cofactors required by the enzyme such as a substrate precursor that provides the detectable chromophore or fluorophore. In addition, other additives may be included such as stabilizers, buffers (for example a block buffer or lysis buffer), and the like. The relative amounts of the various reagents may be varied

widely to provide for concentrations in solution of the reagents that substantially optimize the sensitivity of the assay. The reagents may be provided as dry powders, usually lyophilized, including excipients that on dissolution will provide a reagent solution having the appropriate concentration.

[00269] Therapeutic Uses

[00270] In another embodiment, a humanized anti-CD40 antibody disclosed herein is useful in the treatment of various disorders associated with the expression of CD40 as described herein.

[00271] The humanized anti-CD40 antibody or agent is administered by any suitable means, including parenteral, subcutaneous, intraperitoneal, intrapulmonary, and intranasal, and, if desired for local immunosuppressive treatment, intralesional administration (including perfusing or otherwise contacting the graft with the antibody before transplantation). The humanized anti-CD40 antibody or agent can be administered, for example, as an infusion or as a bolus. Parenteral infusions include intramuscular, intravenous, intraarterial, intraperitoneal, or subcutaneous administration. In addition, the humanized anti-CD40 antibody is suitably administered by pulse infusion, particularly with declining doses of the antibody. In one aspect, the dosing is given by injections, most preferably intravenous or subcutaneous injections, depending in part on whether the administration is brief or chronic.

[00272] For the prevention or treatment of disease, the appropriate dosage of antibody will depend on a variety of factors such as the type of disease to be treated, as defined above, the severity and course of the disease, whether the antibody is administered for preventive or therapeutic purposes, previous therapy, the patient's clinical history and response to the antibody, and the discretion of the attending physician. The antibody is suitably administered to the patient at one time or over a series of treatments.

[00273] Depending on the type and severity of the disease, about 1 $\mu\text{g/kg}$ to 20 mg/kg (e.g., 0.1-15 mg/kg) of antibody is an initial candidate dosage for administration to the patient, whether, for example, by one or more separate administrations, or by continuous infusion. A typical daily dosage might range from about 1 $\mu\text{g/kg}$ to 100

mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. For repeated administrations over several days or longer, depending on the condition, the treatment is sustained until a desired suppression of disease symptoms occurs. However, other dosage regimens may be useful. The progress of this therapy is easily monitored by conventional techniques and assays. An exemplary dosing regimen is that disclosed in WO 94/04188.

[00274] The term "suppression" is used herein in the same context as "amelioration" and "alleviation" to mean a lessening of one or more characteristics of the disease.

[00275] The antibody composition will be formulated, dosed, and administered in a fashion consistent with good medical practice. Factors for consideration in this context include the particular disorder being treated, the particular mammal being treated, the clinical condition of the individual patient, the cause of the disorder, the site of delivery of the agent, the method of administration, the scheduling of administration, and other factors known to medical practitioners. The "therapeutically effective amount" of the antibody to be administered will be governed by such considerations, and is the minimum amount necessary to prevent, ameliorate, or treat the disorder associated with CD40 expression.

[00276] The antibody need not be, but is optionally, formulated with one or more agents currently used to prevent or treat the disorder in question. The effective amount of such other agents depends on the amount of humanized anti-CD40 antibody present in the formulation, the type of disorder or treatment, and other factors discussed above. These are generally used in the same dosages and with administration routes as used hereinbefore or about from 1 to 99% of the heretofore employed dosages.

[00277] CD40-Associated Disorders

[00278] The anti-CD40 antibodies or agents are useful for treating or preventing a CD40-expressing cancer or an immunological disorder characterized by expression of CD40, e.g., by inappropriate activation of immune cells (e.g., lymphocytes or dendritic cells). Such expression of CD40 can be due to, for example, increased CD40 protein levels on the cells surface and/or altered antigenicity of the expressed CD40. Treatment

or prevention of the immunological disorder, according to the methods described herein, is achieved by administering to a subject in need of such treatment or prevention an effective amount of the anti-CD40 antibody or agent, whereby the antibody (i) binds to activated immune cells that express CD40 and that are associated with the disease state and (ii) exerts a cytotoxic, cytostatic, or immunosuppressive effect on the activated immune cells.

[00279] Immunological diseases that are characterized by inappropriate activation of immune cells and that can be treated or prevented by the methods described herein can be classified, for example, by the type(s) of hypersensitivity reaction(s) that underlie the disorder. These reactions are typically classified into four types: anaphylactic reactions, cytotoxic (cytolytic) reactions, immune complex reactions, or cell-mediated immunity (CMI) reactions (also referred to as delayed-type hypersensitivity (DTH) reactions). (See, e.g., Fundamental Immunology (William E. Paul ed., Raven Press, N.Y., 3rd ed. 1993).)

[00280] Specific examples of such immunological diseases include the following: rheumatoid arthritis, autoimmune demyelinating diseases (e.g., multiple sclerosis, allergic encephalomyelitis), endocrine ophthalmopathy, uveoretinitis, systemic lupus erythematosus, myasthenia gravis, Grave's disease, glomerulonephritis, autoimmune hepatological disorder, inflammatory bowel disease (e.g., Crohn's disease or ulcerative colitis), anaphylaxis, allergic reaction, Sjogren's syndrome, type I diabetes mellitus, primary biliary cirrhosis, Wegener's granulomatosis, fibromyalgia, polymyositis, dermatomyositis, inflammatory myositis, multiple endocrine failure, Schmidt's syndrome, autoimmune uveitis, Addison's disease, adrenalitis, thyroiditis, Hashimoto's thyroiditis, autoimmune thyroid disease, pernicious anemia, gastric atrophy, chronic hepatitis, lupoid hepatitis, atherosclerosis, subacute cutaneous lupus erythematosus, hypoparathyroidism, Dressler's syndrome, autoimmune thrombocytopenia, idiopathic thrombocytopenic purpura, hemolytic anemia, pemphigus vulgaris, pemphigus, dermatitis herpetiformis, alopecia areata, pemphigoid, scleroderma, progressive systemic sclerosis, CREST syndrome (calcinosis, Raynaud's phenomenon, esophageal dysmotility, sclerodactyl), and telangiectasia), male and female autoimmune infertility, ankylosing spondylitis, ulcerative colitis, mixed connective tissue disease, polyarteritis

nedosa, systemic necrotizing vasculitis, atopic dermatitis, atopic rhinitis, Goodpasture's syndrome, Chagas' disease, sarcoidosis, rheumatic fever, asthma, recurrent abortion, anti-phospholipid syndrome, farmer's lung, erythema multiforme, post cardiectomy syndrome, Cushing's syndrome, autoimmune chronic active hepatitis, bird-fancier's lung, toxic epidermal necrolysis, Alport's syndrome, alveolitis, allergic alveolitis, fibrosing alveolitis, interstitial lung disease, erythema nodosum, pyoderma gangrenosum, transfusion reaction, Takayasu's arteritis, polymyalgia rheumatica, temporal arteritis, schistosomiasis, giant cell arteritis, ascariasis, aspergillosis, Sampter's syndrome, eczema, lymphomatoid granulomatosis, Behcet's disease, Caplan's syndrome, Kawasaki's disease, dengue, encephalomyelitis, endocarditis, endomyocardial fibrosis, endophthalmitis, erythema elevatum et diutinum, psoriasis, erythroblastosis fetalis, eosinophilic fasciitis, Shulman's syndrome, Felty's syndrome, filariasis, cyclitis, chronic cyclitis, heterochronic cyclitis, Fuch's cyclitis, IgA nephropathy, Henoch-Schönlein purpura, graft versus host disease, transplantation rejection, cardiomyopathy, Eaton-Lambert syndrome, relapsing polychondritis, cryoglobulinemia, Waldenström's macroglobulemia, Evan's syndrome, acute respiratory distress syndrome, pulmonary inflammation, osteoporosis, delayed type hypersensitivity and autoimmune gonadal failure.

[00281] Accordingly, the methods described herein encompass treatment of disorders of B lymphocytes (e.g., systemic lupus erythematosus, Goodpasture's syndrome, rheumatoid arthritis, and type I diabetes), Th₁-lymphocytes (e.g., rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, psoriasis, Sjögren's syndrome, Hashimoto's thyroiditis, Grave's disease, primary biliary cirrhosis, Wegener's granulomatosis, tuberculosis, or graft versus host disease), or Th₂-lymphocytes (e.g., atopic dermatitis, systemic lupus erythematosus, atopic asthma, rhinoconjunctivitis, allergic rhinitis, Omenn's syndrome, systemic sclerosis, or chronic graft versus host disease). Generally, disorders involving dendritic cells involve disorders of Th₁-lymphocytes or Th₂-lymphocytes.

[00282] Rheumatoid arthritis (RA) is one of the most common inflammatory autoimmune diseases affecting approximately 1% of the population. While efficacious treatments (e.g. MTX and the anti-TNF agents) are available, there exists great unmet medical need, especially for those patients who do not adequately respond to anti-TNF

therapies (about 30% of patients). In addition, up to 50% of patients discontinue TNF-antagonist treatment within 5 years, mainly due to adverse events but also because an increasingly recognized number of patients lose therapeutic benefit. It is thus important to establish effective therapies that target inflammation and joint destruction in RA but do not rely solely on the direct inhibition of TNF. A very attractive approach is to target co-stimulatory cell pathways. One of the key receptor-ligand pairs in costimulation is CD40/CD40L. This system allows interactions between immune cells, and between immune and non-immune cells, all of which are important in the pathogenesis of RA. Blockade of CD40 with an antagonistic antibody of the present invention may have one of more of the following effect in RA:

[00283] 1) Inhibit B cell differentiation and antibody isotype switching;

[00284] 2) Inhibit cytokine and chemokine production and up-regulation of adhesion molecules in T-cells and macrophages;

[00285] 3) Inhibit the activation of dendritic cells and

[00286] 4) Inhibit production of proinflammatory cytokines, chemokines, matrix metalloproteinases, prostaglandins, and down-regulate adhesion molecules in non-immune cells (e.g. epithelial, endothelial and mesenchymal cells).

[00287] Methods of achieving one of more of the above effects are expressly contemplated herein. In addition to RA, the compositions of the present invention will be particularly useful in methods of treatment of Multiple Sclerosis, Psoriasis (including Psoriatic Arthritis), Juvenile Rheumatoid Arthritis, Inflammatory Bowel Disease, Systemic Lupus Erythematosus, and Solid Organ Transplantation.

[00288] Rheumatoid Arthritis (RA) is a chronic, systemic autoimmune disease with a prevalence of approximately 1% in adults. The disease continues to cause significant morbidity and premature mortality (mortality is predominantly due to accelerated cardiovascular disease). It has now been identified that joint damage occurs very early in the course of the disease with up to 30% of patients showing radiographic evidence of bony erosions at the time of diagnosis, increasing to 60% after 1 year. Current guidelines recommend initiating therapy with traditional disease-modifying antirheumatic

drugs (DMARDs) within 3 months after a definite diagnosis has been established. DMARDs have the potential to reduce or prevent joint damage and preserve joint function. Currently, rheumatologists select methotrexate (MTX) as the initial DMARD therapy for most patients.

[00289] The TNF-antagonists etanercept (Enbrel®), infliximab (Remicade®), adalimumab (Humira®), the CTLA4-antagonist abatacept (Orencia®), the anti-IL-6 receptor mAb tocilizumab and the anti-CD20 mAb rituximab (Rituxan®) are efficacious in the treatment of RA. Current guidelines generally recommend using biologic DMARDs for the treatment of active RA after an inadequate response to traditional DMARDs.

[00290] Recent studies in patients with early aggressive RA without previous MTX treatment showed that the combination of MTX with a TNF-antagonist was superior to each when used as monotherapy. The most striking result was the significant radiological benefit of the combination therapy. Thus, the combination of MTX and TNF-inhibitors should be used in patients at greatest risk for aggressive disease and aggressive phenotype (e.g. high activity score, functional impairment, seropositivity for rheumatoid factor (RF) or anti-cyclic citrullinated peptide antibody (CCP), elevated CRP, radiographic erosions). However, we anticipate that in clinical practice it will be rare that TNF-antagonists will be used as a first-line therapy. A survey of US rheumatologists conducted in April 2005 showed that the factors that most influence the decision to use a TNF-antagonist were: failure of MTX or multiple DMARDs, physician global assessment, functional impairment, and radiographic worsening or erosions. Currently, an estimated 20% of patients with RA receive TNF-inhibitor therapy in the US.

[00291] A substantial percentage of RA patients are not adequately helped with the current treatments including biologic therapies, either because of drug intolerance and toxicity or lack of response. Up to 50% of patients discontinue TNF-antagonist treatment within 5 years, mainly due to adverse events but also because an increasingly recognized number of patients lose their response.

[00292] In some embodiments, the immunological disorder is a T cell-mediated immunological disorder, such as a T cell disorder in which activated T cells associated

with the disorder express CD40. Anti-CD40 antibodies or agents can be administered to deplete such CD40-expressing activated T cells. In a specific embodiment, administration of anti-CD40 antibodies or agents can deplete CD40-expressing activated T cells, while resting T cells are not substantially depleted by the anti-CD40 or agent. In this context, "not substantially depleted" means that less than about 60%, or less than about 70% or less than about 80% of resting T cells are not depleted.

[00293] The anti-CD40 antibodies and agents as described herein are also useful for treating or preventing a CD40-expressing cancer. Treatment or prevention of a CD40-expressing cancer, according to the methods described herein, is achieved by administering to a subject in need of such treatment or prevention an effective amount of the anti-CD40 antibody or agent, whereby the antibody or agent (i) binds to CD40-expressing cancer cells and (ii) exerts a cytotoxic or cytostatic effect to deplete or inhibit the proliferation of the CD40-expressing cancer cells.

[00294] CD40-expressing cancers that can be treated or prevented by the methods described herein include, for example, leukemia, such as acute leukemia, acute lymphocytic leukemia, acute myelocytic leukemia (e.g., myeloblastic, promyelocytic, myelomonocytic, monocytic, or erythroleukemia), chronic leukemia, chronic myelocytic (granulocytic) leukemia, or chronic lymphocytic leukemia; Polycythemia vera; Lymphoma (e.g., Hodgkin's disease or Non-Hodgkin's disease); multiple myeloma, Waldenstrom's macroglobulinemia; heavy chain disease; solid tumors such sarcomas and carcinomas (e.g., fibrosarcoma, myxosarcoma, liposarcoma, chondrosarcoma, osteogenic sarcoma, osteosarcoma, chordoma, angiosarcoma, endotheliosarcoma, lymphangiosarcoma, lymphangioendotheliosarcoma, synovioma, mesothelioma, Ewing's tumor, leiomyosarcoma, rhabdomyosarcoma, colon carcinoma, colorectal carcinoma, pancreatic cancer, breast cancer, ovarian cancer, prostate cancer, squamous cell carcinoma, basal cell carcinoma, adenocarcinoma, sweat gland carcinoma, sebaceous gland carcinoma, papillary carcinoma, papillary adenocarcinomas, cystadenocarcinoma, medullary carcinoma, bronchogenic carcinoma, renal cell carcinoma, hepatoma, bile duct carcinoma, choriocarcinoma, seminoma, embryonal carcinoma, Wilms' tumor, cervical cancer, uterine cancer, testicular tumor, lung carcinoma, small cell lung

carcinoma, non small cell lung carcinoma, bladder carcinoma, epithelial carcinoma, glioma, astrocytoma, medulloblastoma, craniopharyngioma, ependymoma, pinealoma, hemangioblastoma, acoustic neuroma, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, nasopharyngeal carcinoma, or esophageal carcinoma).

[00295] Pharmaceutical Compositions and Administration Thereof

[00296] A composition comprising a CD40 binding agent (e.g., an anti-CD40 antibody) can be administered to a subject having or at risk of having an immunological disorder or a CD40-expressing cancer. The invention further provides for the use of a CD40 binding agent (e.g., an anti-CD40 antibody) in the manufacture of a medicament for prevention or treatment of a CD40 expressing cancer or immunological disorder. The term "subject" as used herein means any mammalian patient to which a CD40-binding agent can be administered, including, e.g., humans and non-human mammals, such as primates, rodents, and dogs. Subjects specifically intended for treatment using the methods described herein include humans. The antibodies or agents can be administered either alone or in combination with other compositions in the prevention or treatment of the immunological disorder or CD40-expressing cancer.

[00297] Preferred antibodies for use in such pharmaceutical compositions are those that comprise humanized antibody or antibody fragment having the heavy chain variable region amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 1 to 4, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, or SEQ ID NO: 40.

[00298] Some embodiments include isolated polynucleotides comprising sequences that encode an antibody or antibody fragment having the light chain variable domain amino acid sequence of SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:31, or SEQ ID NO:36. Particularly preferred humanized antibodies compositions comprise an antibody or antibody fragment having a heavy chain variable domain and a light chain variable region comprising the amino acid sequences of SEQ ID NO:27 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:28 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:29 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:30 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:32

and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:33 and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:34 and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:35 and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:37 and SEQ ID NO:36, respectively; SEQ ID NO:38 and SEQ ID NO:36, respectively; SEQ ID NO:39 and SEQ ID NO:36, respectively; SEQ ID NO:40 and SEQ ID NO:36, respectively. Contemplated within the present invention are isolated polynucleotides that encode any of the heavy chain sequences of SEQ ID NO: 1 to 4, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, or SEQ ID NO: 73. Other embodiments are directed to isolated nucleic acids that encode a light chain sequence of any of sequences of SEQ ID NO: 5 to SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, or SEQ ID NO:76.

[00299] In certain embodiments, where the treatment of RA is contemplated, the compositions of the invention may be used in methods for reducing signs and symptoms, inducing a major clinical response and reducing the progression of structural damage in patients with moderately to severely active RA who do not respond adequately to MTX alone. A current exemplary such therapy is: Enbrel/Humira (Data with Humira and Enbrel were obtained in two different patient populations). The compositions of the present invention may be used instead of an Enbrel/Humira therapy or in combination with Enbrel/Humira therapy for subjects that do not respond to MTX alone. Preferably, in such embodiments, the compositions of the invention will have a superior efficacy to Enbrel +MTX in patients who have had an inadequate response to methotrexate as determined for example by: ACR20 at 6 months >85% for compound plus MTX (GS: Enbrel +MTX 71% vs. Placebo + MTX 27%, Humira + MTX at 12 mos 59% vs. Placebo + MTX 24%)*. Additional criteria for superior efficacy of the

compositions of the invention may include: Inhibition of progression of structural damage over a period of one year similar to Enbrel (after 52 weeks mean modified Sharp score Humira + MTX 0.1 vs. Placebo + MTX 2.7)*. In still other embodiments, the compositions produce a "Major Clinical Response" superior to Enbrel in patients that have had an inadequate response to methotrexate as measured by ACR70 (20% for Humira + MTX, 4% for Placebo + MTX)*.

[00300] In other embodiments, the compositions of the invention may be indicated for reducing signs and symptoms, inducing a major clinical response and reducing the progression of structural damage in patients with moderately to severely active RA who have had an inadequate response to anti-TNF agents. The current Gold standard: non-anti-TNF biologic therapy. Preferably, in such subjects the compositions of the invention possess non-inferior efficacy compared to non-anti-TNF biological (e.g. Orencia, Rituxan) by historical comparison in patients who have had an inadequate response to an anti-TNF agent: ACR20 at 6 months >50% for compound plus DMARD (GS: Orencia + DMARD 50% vs. placebo + DMARD 20%). In still other embodiments, the compositions of the invention inhibit progression of structural damage over a period of one year assessed by accepted X-ray scoring methods for joint erosion and joint space narrowing, similar to Rituxan (after 52 weeks mean modified Sharp score Rituxan + MTX 1.0 vs. Placebo + MTX 2.31).

[00301] Various delivery systems are known and can be used to administer the CD40 binding agent. Methods of introduction include but are not limited to intradermal, intramuscular, intraperitoneal, intravenous, subcutaneous, intranasal, epidural, and oral routes. The CD40 binding agent can be administered, for example by infusion, bolus or injection, and can be administered together with other biologically active agents such as chemotherapeutic agents. Administration can be systemic or local. In preferred embodiments, the administration is by subcutaneous injection. Formulations for such injections may be prepared in for example prefilled syringes that may be administered once every other week.

[00302] The safety characteristics of the antibodies of the invention will be determined and preferably include one or more features such as: no clinically significant

adverse interactions with other medications commonly used to treat Rheumatoid Arthritis (e.g. DMARDs, Steroids, NSAIDs,); No greater rate of discontinuations due to safety or tolerability issues compared to Enbrel; Rate of serious infections no greater than anti-TNF agents or other commonly used biologic agents; Frequency and/or severity of injection site reactions or infusion reaction similar to Enbrel; No or minimal development of drug resistance (less than 5%) upon repeat cycles of therapy; No or minimal neutralizing antibodies; No evidence of enhanced platelet aggregation/activation that could lead to thromboembolic events in vivo or platelet/endothelial dysfunction that could lead to bleeding.

[00303] In specific embodiments, the CD40 binding agent composition is administered by injection, by means of a catheter, by means of a suppository, or by means of an implant, the implant being of a porous, non-porous, or gelatinous material, including a membrane, such as a sialastic membrane, or a fiber. Typically, when administering the composition, materials to which the anti-CD40 antibody or agent does not absorb are used.

[00304] In other embodiments, the anti-CD40 antibody or agent is delivered in a controlled release system. In one embodiment, a pump may be used (see, e.g., Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533; Sefton, 1989, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201; Buchwald et al., 1980, *Surgery* 88:507; Saudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). In another embodiment, polymeric materials can be used. (See, e.g., *Medical Applications of Controlled Release* (Langer and Wise eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance* (Smolen and Ball eds., Wiley, New York, 1984); Ranger and Peppas, 1983, *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61. See also Levy et al., 1985, *Science* 228:190; During et al., 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard et al., 1989, *J. Neurosurg.* 71:105.) Other controlled release systems are discussed, for example, in Langer, *supra*.

[00305] A CD40 binding agent (e.g., an anti-CD40 antibody) can be administered as pharmaceutical compositions comprising a therapeutically effective amount of the binding agent and one or more pharmaceutically compatible ingredients.

[00306] In typical embodiments, the pharmaceutical composition is formulated in accordance with routine procedures as a pharmaceutical composition adapted for intravenous or subcutaneous administration to human beings. Typically, compositions for administration by injection are solutions in sterile isotonic aqueous buffer. Where necessary, the pharmaceutical can also include a solubilizing agent and a local anesthetic such as lignocaine to ease pain at the site of the injection. Generally, the ingredients are supplied either separately or mixed together in unit dosage form, for example, as a dry lyophilized powder or water free concentrate in a hermetically sealed container such as an ampoule or sachette indicating the quantity of active agent. Where the pharmaceutical is to be administered by infusion, it can be dispensed with an infusion bottle containing sterile pharmaceutical grade water or saline. Where the pharmaceutical is administered by injection, an ampoule of sterile water for injection or saline can be provided so that the ingredients can be mixed prior to administration.

[00307] Further, the pharmaceutical composition can be provided as a pharmaceutical kit comprising (a) a container containing a CD40 binding agent (e.g., an anti-CD40 antibody) in lyophilized form and (b) a second container containing a pharmaceutically acceptable diluent (e.g., sterile water) for injection. The pharmaceutically acceptable diluent can be used for reconstitution or dilution of the lyophilized anti-CD40 antibody or agent. Optionally associated with such container(s) can be a notice in the form prescribed by a governmental agency regulating the manufacture, use or sale of pharmaceuticals or biological products, which notice reflects approval by the agency of manufacture, use or sale for human administration.

[00308] The amount of the CD40 binding agent (e.g., anti-CD40 antibody) that is effective in the treatment or prevention of an immunological disorder or CD40-expressing cancer can be determined by standard clinical techniques. In addition, in vitro assays may optionally be employed to help identify optimal dosage ranges. The precise dose to be employed in the formulation will also depend on the route of administration, and the stage of immunological disorder or CD40-expressing cancer, and should be decided according to the judgment of the practitioner and each patient's circumstances. Effective doses may be extrapolated from dose-response curves derived from in vitro or animal model test systems.

[00309] For example, toxicity and therapeutic efficacy of the anti-CD40 antibody or agent can be determined in cell cultures or experimental animals by standard pharmaceutical procedures for determining the ED₅₀ (the dose therapeutically effective in 50% of the population). A CD40-binding agent (e.g., an anti-CD40 antibody) that exhibits a large therapeutic index is preferred. Where a CD40-binding agent exhibits toxic side effects, a delivery system that targets the CD40-binding agent to the site of affected tissue can be used to minimize potential damage non-CD40-expressing cells and, thereby, reduce side effects.

[00310] The data obtained from the cell culture assays and animal studies can be used in formulating a range of dosage for use in humans. The dosage of the CD40 binding agent typically lies within a range of circulating concentrations that include the ED₅₀ with little or no toxicity. The dosage may vary within this range depending upon the dosage form employed and the route of administration utilized. For any CD40 binding agent used in the method, the therapeutically effective dose can be estimated initially from cell culture assays. A dose can be formulated in animal models to achieve a circulating plasma concentration range that includes the IC₅₀ (i.e., the concentration of the test compound that achieves a half-maximal inhibition of symptoms) as determined in cell culture. Such information can be used to more accurately determine useful doses in humans. Levels in plasma can be measured, for example, by high performance liquid chromatography, ELISA and the like.

[00311] Generally, the dosage of an anti-CD40 antibody or CD40 binding agent administered to a patient with an immunological disorder or CD40-expressing cancer is typically about 0.1 mg/kg to about 100 mg/kg of the subject's body weight. The dosage administered to a subject is about 0.1 mg/kg to about 50 mg/kg, about 1 mg/kg to about 30 mg/kg, about 1 mg/kg to about 20 mg/kg, about 1 mg/kg to about 15 mg/kg, or about 1 mg/kg to about 10 mg/kg of the subject's body weight.

[00312] Exemplary doses include, but are not limited to, from 1 ng/kg to 100 mg/kg. In some embodiments, a dose is about 0.5 mg/kg, about 1 mg/kg, about 2 mg/kg, about 3 mg/kg, about 4 mg/kg, about 5 mg/kg, about 6 mg/kg, about 7 mg/kg, about 8 mg/kg, about 9 mg/kg, about 10 mg/kg, about 11 mg/kg, about 12 mg/kg, about

13 mg/kg, about 14 mg/kg, about 15 mg/kg or about 16 mg/kg. The dose can be administered, for example, daily, once per week (weekly), twice per week, thrice per week, four times per week, five times per week, six times per week, biweekly or monthly, every two months, or every three months. In specific embodiments, the dose is about 0.5 mg/kg/week, about 1 mg/kg/week, about 2 mg/kg/week, about 3 mg/kg/week, about 4 mg/kg/week, about 5 mg/kg/week, about 6 mg/kg/week, about 7 mg/kg/week, about 8 mg/kg/week, about 9 mg/kg/week, about 10 mg/kg/week, about 11 mg/kg/week, about 12 mg/kg/week, about 13 mg/kg/week, about 14 mg/kg/week, about 15 mg/kg/week or about 16 mg/kg/week. In some embodiments, the dose ranges from about 1 mg/kg/week to about 15 mg/kg/week.

[00313] In some embodiments, the pharmaceutical compositions comprising the CD40 binding agent can further comprise a therapeutic agent, either conjugated or unconjugated to the binding agent. The anti-CD40 antibody or CD40 binding agent can be co-administered in combination with one or more therapeutic agents for the treatment or prevention of immunological disorders or CD40-expressing cancers. For example, combination therapy can include a cytostatic, cytotoxic, or immunosuppressive agent. Combination therapy can also include, e.g., administration of an agent that targets a receptor or receptor complex other than CD40 on the surface of activated lymphocytes, dendritic cells or CD40-expressing cancer cells. An example of such an agent includes a second, non-CD40 antibody that binds to a molecule at the surface of an activated lymphocyte, dendritic cell or CD40-expressing cancer cell. Another example includes a ligand that targets such a receptor or receptor complex. Typically, such an antibody or ligand binds to a cell surface receptor on activated lymphocytes, dendritic cell or CD40-expressing cancer cell and enhances the cytotoxic or cytostatic effect of the anti-CD40 antibody by delivering a cytostatic or cytotoxic signal to the activated lymphocyte, dendritic cell or CD40-expressing cancer cell.

[00314] Such combination therapy administration can have an additive or synergistic effect on disease parameters (e.g., severity of a symptom, the number of symptoms, or frequency of relapse).

[00315] With respect to therapeutic regimens for combinatorial administration, in a specific embodiment, an anti-CD40 antibody or CD40 binding agent is administered concurrently with a therapeutic agent. In another specific embodiment, the therapeutic agent is administered prior or subsequent to administration of the anti-CD40 antibody or CD40 binding agent, by at least an hour and up to several months, for example at least an hour, five hours, 12 hours, a day, a week, a month, or three months, prior or subsequent to administration of the anti-CD40 antibody or CD40 binding agent.

[00316] Useful classes of cytotoxic or immunosuppressive agents include, for example, antitubulin agents, auristatins (e.g., MMAE, or MMAF), DNA minor groove binders, DNA replication inhibitors, alkylating agents (e.g., platinum complexes such as cis-platin, mono(platinum), bis(platinum) and tri-nuclear platinum complexes and carboplatin), anthracyclines, antibiotics, antifolates, antimetabolites, chemotherapy sensitizers, duocarmycins, etoposides, fluorinated pyrimidines, ionophores, lexitropsins, nitrosoureas, platinols, pre-forming compounds, purine antimetabolites, puromycins, radiation sensitizers, steroids, taxanes, topoisomerase inhibitors, vinca alkaloids, or the like.

[00317] Individual cytotoxic or immunosuppressive agents include, for example, an androgen, anthramycin (AMC), asparaginase, 5-azacytidine, azathioprine, bleomycin, busulfan, buthionine sulfoximine, camptothecin, carboplatin, carmustine (BSNU), CC-1065, chlorambucil, cisplatin, colchicine, cyclophosphamide, cytarabine, cytidine arabinoside, cytochalasin B, dacarbazine, dactinomycin (formerly actinomycin), daunorubicin, decarbazine, docetaxel, doxorubicin, an estrogen, 5-fluorodeoxyuridine, 5-fluorouracil, gramicidin D, hydroxyurea, idarubicin, ifosfamide, irinotecan, lomustine (CCNU), mechlorethamine, melphalan, 6-mercaptopurine, methotrexate, mithramycin, mitomycin C, mitoxantrone, nitroimidazole, paclitaxel, plicamycin, procarbazine, streptozotocin, tenoposide, 6-thioguanine, thioTEPA, topotecan, vinblastine, vincristine, vinorelbine, VP-16 and VM-26.

[00318] In some typical embodiments, the therapeutic agent is a cytotoxic agent. Suitable cytotoxic agents include, for example, dolastatins (e.g., auristatin E, AFP, MMAF, MMAE, AEB or AEVB), DNA minor groove binders (e.g., enediynes and

lexitropsins), duocarmycins, taxanes (e.g., paclitaxel and docetaxel), puromycins, vinca alkaloids, CC-1065, SN-38, topotecan, morpholino-doxorubicin, rhizoxin, cyanomorpholino-doxorubicin, echinomycin, combretastatin, netropsin, epothilone A and B, estramustine, cryptophysins, cemadotin, maytansinoids, discodermolide, eleutherobin, or mitoxantrone.

[00319] In some embodiments, the cytotoxic agent is a conventional chemotherapeutic such as, for example, doxorubicin, paclitaxel, melphalan, vinca alkaloids, methotrexate, mitomycin C or etoposide. In addition, potent agents such as CC-1065 analogues, calicheamicin, maytansine, analogues of dolastatin 10, rhizoxin, and palytoxin can be linked to the anti-CD40 antibodies or agents thereof.

[00320] In specific embodiments, the cytotoxic or cytostatic agent is auristatin E (also known in the art as dolastatin-10) or a derivative thereof. Typically, the auristatin E derivative is, e.g., an ester formed between auristatin E and a keto acid. For example, auristatin E can be reacted with paraacetyl benzoic acid or benzoylvaleric acid to produce AEB and AEVB, respectively. Other typical auristatin derivatives include AFP, MMAF, and MMAE. The synthesis and structure of auristatin E and its derivatives are described in, for example, U.S. Patent Application Publication Nos. 2004-0157782 A1 and 2005-0238649; International Patent Application No. PCT/US03/24209, International Patent Application No. PCT/US02/13435, and U.S. Pat. Nos. 6,884,869; 6,323,315; 6,239,104; 6,034,065; 5,780,588; 5,665,860; 5,663,149; 5,635,483; 5,599,902; 5,554,725; 5,530,097; 5,521,284; 5,504,191; 5,410,024; 5,138,036; 5,076,973; 4,986,988; 4,978,744; 4,879,278; 4,816,444; and 4,486,414; the disclosures of which are incorporated by reference herein.

[00321] In specific embodiments, the cytotoxic agent is a DNA minor groove binding agent. (See, e.g., U.S. Pat. No. 6,130,237.) For example, in some embodiments, the minor groove binding agent is a CBI compound. In other embodiments, the minor groove binding agent is an enediyne (e.g., calicheamicin).

[00322] Examples of anti-tubulin agents include, but are not limited to, taxanes (e.g., Taxol® (paclitaxel), Taxotere® (docetaxel)), T67 (Tularik), vinca alkaloids (e.g., vincristine, vinblastine, vindesine, and vinorelbine), and dolastatins (e.g., auristatin E,

AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB). Other antitubulin agents include, for example, baccatin derivatives, taxane analogs (e.g., epothilone A and B), nocodazole, colchicine and colcimid, estramustine, cryptophysins, cemadotin, maytansinoids, combretastatins, discodermolide, and eleutherobin.

[00323] In some embodiments, the cytotoxic agent is a maytansinoid, another group of anti-tubulin agents. For example, in specific embodiments, the maytansinoid is maytansine or DM-1 (ImmunoGen, Inc.; see also Chari et al., 1992, Cancer Res. 52:127-131).

[00324] In some embodiments, the therapeutic agent is not a radioisotope.

[00325] In some embodiments, the cytotoxic or immunosuppressive agent is an antimetabolite. The antimetabolite can be, for example, a purine antagonist (e.g., azothioprine or mycophenolate mofetil), a dihydrofolate reductase inhibitor (e.g., methotrexate), acyclovir, gangcyclovir, zidovudine, vidarabine, ribavirin, azidothymidine, cytidine arabinoside, amantadine, dideoxyuridine, iododeoxyuridine, poscamet, or trifluridine.

[00326] In other embodiments, the cytotoxic or immunosuppressive agent is tacrolimus, cyclosporine or rapamycin. In further embodiments, the cytotoxic agent is aldesleukin, alemtuzumab, alitretinoin, allopurinol, altretamine, amifostine, anastrozole, arsenic trioxide, bexarotene, bexarotene, calusterone, capecitabine, celecoxib, cladribine, Darbepoetin alfa, Denileukin diftitox, dexrazoxane, dromostanolone propionate, epirubicin, Epoetin alfa, estramustine, exemestane, Filgrastim, floxuridine, fludarabine, fulvestrant, gemcitabine, gemtuzumab ozogamicin, goserelin, idarubicin, ifosfamide, imatinib mesylate, Interferon alfa-2a, irinotecan, letrozole, leucovorin, levamisole, meclorethamine or nitrogen mustard, megestrol, mesna, methotrexate, methoxsalen, mitomycin C, mitotane, nandrolone phenpropionate, oprelvekin, oxaliplatin, pamidronate, pegademase, pegaspargase, pegfilgrastim, pentostatin, pipobroman, plicamycin, porfimer sodium, procarbazine, quinacrine, rasburicase, revlimid, Sargramostim, streptozocin, tamoxifen, temozolomide, teniposide, testolactone, thioguanine, toremifene, Tositumomab, Trastuzumab, tretinoin, uracil mustard, valrubicin, vinblastine, vincristine, vinorelbine and zoledronate.

[00327] In additional embodiments, the drug is a humanized anti-HER2 monoclonal antibody; RITUXAN (rituximab; Genentech, Inc., South San Francisco, Calif.); a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody; OVAREX (AltaRex Corporation, MA); PANOREX (Glaxo Wellcome, NC; a murine IgG2a antibody); Cetuximab Erbitux (Imclone Systems Inc., NY; an anti-EGFR IgG chimeric antibody); Vitaxin (MedImmune, Inc., MD); Campath I/H (Leukosite, MA; a humanized IgG1 antibody); Smart MI95 (Protein Design Labs, Inc., CA; a humanized anti-CD33 IgG antibody); LymphoCide (Immunomedics, Inc., NJ; a humanized anti-CD22 IgG antibody); Smart ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA; a humanized anti-HLA-DR antibody); Oncolym (Techniclone, Inc., CA; a radiolabeled murine anti-HLA-Dr10 antibody); Allomune (BioTransplant, CA; a humanized anti-CD2 mAb); Avastin (Genentech, Inc., CA; an anti-VEGF humanized antibody); Epratuzamab (Immunomedics, Inc., NJ and Amgen, CA; an anti-CD22 antibody); and CEAcide (Immunomedics, NJ; a humanized anti-CEA antibody).

[00328] Other suitable antibodies include, but are not limited to, antibodies against the following antigens: CA125, CA15-3, CA19-9, L6, Lewis Y, Lewis X, alpha fetoprotein, CA 242, placental alkaline phosphatase, prostate specific antigen, prostatic acid phosphatase, epidermal growth factor, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, anti transferrin receptor, p97, MUC1-KLH, CEA, gp100, MART1, Prostate Specific Antigen, IL-2 receptor, CD20, CD52, CD33, CD22, human chorionic gonadotropin, CD38, mucin, P21, MPG, and Neu oncogene product.

[00329] In some embodiments, the therapeutic agent is an immunosuppressive agent. The immunosuppressive agent can be, for example, gancyclovir, etanercept, tacrolimus, cyclosporine, rapamycin, cyclophosphamide, azathioprine, mycophenolate mofetil or methotrexate. Alternatively, the immunosuppressive agent can be, for example, a glucocorticoid (e.g., cortisol or aldosterone) or a glucocorticoid analogue (e.g., prednisone or dexamethasone).

[00330] Suitable cyclooxygenase inhibitors include meclofenamic acid, mefenamic acid, carprofen, diclofenac, diflunisal, fenbufen, fenoprofen, ibuprofen, indomethacin, ketoprofen, nabumetone, naproxen, sulindac, tenoxicam, tolmetin, and acetylsalicylic acid.

[00331] Suitable lipoxygenase inhibitors include redox inhibitors (e.g., catechol butane derivatives, nordihydroguaiaretic acid (NDGA), masoprocol, phenidone, lanopalen, indazolinones, naphazatrom, benzofuranol, alkylhydroxylamine), and non-redox inhibitors (e.g., hydroxythiazoles, methoxyalkylthiazoles, benzopyrans and derivatives thereof, methoxytetrahydropyran, boswellic acids and acetylated derivatives of boswellic acids, and quinolinemethoxyphenylacetic acids substituted with cycloalkyl radicals), and precursors of redox inhibitors.

[00332] Other suitable lipoxygenase inhibitors include antioxidants (e.g., phenols, propyl gallate, flavonoids and/or naturally occurring substrates containing flavonoids, hydroxylated derivatives of the flavones, flavonol, dihydroquercetin, luteolin, galangin, orobol, derivatives of chalcone, 4,2',4'-trihydroxychalcone, ortho-aminophenols, N-hydroxyureas, benzofuranols, ebselen and species that increase the activity of the reducing selenoenzymes), iron chelating agents (e.g., hydroxamic acids and derivatives thereof, N-hydroxyureas, 2-benzyl-1-naphthol, catechols, hydroxylamines, carnosol trolox C, catechol, naphthol, sulfasalazine, zileuton, 5-hydroxyanthranilic acid and 4-(omega-arylalkyl)phenylalkanoic acids), imidazole-containing compounds (e.g., ketoconazole and itraconazole), phenothiazines, and benzopyran derivatives.

[00333] Yet other suitable lipoxygenase inhibitors include inhibitors of eicosanoids (e.g., octadecatetraenoic, eicosatetraenoic, docosapentaenoic, eicosahexaenoic and docosahexaenoic acids and esters thereof, PGE1 (prostaglandin E1), PGA2 (prostaglandin A2), viprostol, 15-monohydroxyeicosatetraenoic, 15-monohydroxy-eicosatrienoic and 15-monohydroxyeicosapentaenoic acids, and leukotrienes B5, C5 and D5), compounds interfering with calcium flows, phenothiazines, diphenylbutylamines, verapamil, fuscocide, curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, 5,8,11,14-eicosatetrayenoic acid (ETYA), hydroxyphenylretinamide, lonapalen, esculin, diethylcarbamazine, phenantrolin, baicalein, proxicromil, thioethers, diallyl sulfide and di-(1-propenyl) sulfide.

[00334] Leukotriene receptor antagonists include calcitriol, ontazolast, Bayer Bay-x-1005, Ciba-Geigy CGS-25019C, ebselen, Leo Denmark ETH-615, Lilly LY-293111, Ono ONO-4057, Terumo TMK-688, Boehringer Ingleheim BI-RM-270, Lilly LY 213024,

Lilly LY 264086, Lilly LY 292728, Ono ONO LB457, Pfizer 105696, Perdue Frederick PF 10042, Rhone-Poulenc Rorer RP 66153, SmithKline Beecham SB-201146, SmithKline Beecham SB-201993, SmithKline Beecham SB-209247, Searle SC-53228, Sumitamo SM 15178, American Home Products WAY 121006, Bayer Bay-o-8276, Warner-Lambert CI-987, Warner-Lambert CI-987BPC-15LY 223982, Lilly LY 233569, Lilly LY-255283, MacroNex MNX-160, Merck and Co. MK-591, Merck and Co. MK-886, Ono ONO-LB-448, Purdue Frederick PF-5901, Rhone-Poulenc Rorer RG 14893, Rhone-Poulenc Rorer RP 66364, Rhone-Poulenc Rorer RP 69698, Shionogi S-2474, Searle SC-41930, Searle SC-50505, Searle SC-51146, Searle SC-52798, SmithKline Beecham SK and F-104493, Leo Denmark SR-2566, Tanabe T-757 and Teijin TEI-1338.

[00335] Articles of Manufacture

[00336] In another aspect, an article of manufacture containing materials useful for the treatment of the disorders described above is included. The article of manufacture comprises a container and a label. Suitable containers include, for example, bottles, vials, syringes, and test tubes. The containers may be formed from a variety of materials such as glass or plastic. The container holds a composition that is effective for treating the condition and may have a sterile access port. For example, the container may be an intravenous solution bag or a vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle. The active agent in the composition is the humanized anti-CD40 antibody. The label on or associated with the container indicates that the composition is used for treating the condition of choice. The article of manufacture may further comprise a second container comprising a pharmaceutically-acceptable buffer, such as phosphate-buffered saline, Ringer's solution, and dextrose solution. It may further include other materials desirable from a commercial and user standpoint, including other buffers, diluents, filters, needles, syringes, and package inserts with instructions for use.

[00337] The invention is further described in the following examples, which are not intended to limit the scope of the invention.

[00338] EXAMPLES

[00339] Example 1: Production of Humanized Anti-CD40 Antibody

[00340] Murine antibodies 20E2, and 2H11 are shown in Tables 1 and 2 herein above. Humanization of the 20E2, and 2H11 clones has been completed. A library was made where human and murine residues were varied in such a way that in any given position there could be either a human or murine residue. Such a library was made for those amino acids that were different between human germline and murine antibody. Only the clones that retain the function of the parent murine antibody were selected.

[00341] In this manner, Antibody a, Antibody B and Antibody C were humanized antibodies derived from mouse antibody 20E2 (Antibody A and Antibody B) or 2H11 (Antibody C) cloned into a human IgG1-KO (KO=knock-out)/kappa backbone. IgG1-KO has two mutations in the Fc region, Leu234Ala and Leu235Ala to reduce FcγR and complement binding.

[00342] The results of such humanization resulted in various humanized heavy and light chain variable sequences shown below:

[00343] SEQ ID NO: 41 (variable light chain sequence):
 DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDF
 TLTISLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGTKVEIK

[00344] SEQ ID NO: 42 (variable heavy chain sequence):
 EVQLVKSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDN
 AKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLLTVSS

[00345] SEQ ID NO:43 (variable light chain sequence)
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDF
 TLTISLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGTKVEIK

[00346] SEQ ID NO: 44 (variable heavy chain sequence)
 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDN
 AKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTLLTVSS

[00347] SEQ ID NO: 45 (variable light chain sequence)
 DIVMTQSPDSLAVSLGEKVTMCKSSQSLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDF
 TLTISLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGAGTKVEIK

[00348] SEQ ID NO: 46 (variable heavy chain sequence)

EVQLVESGGGLVKPGGSRRLSCAASGFTTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWGQGTILVTVSS.

[00349] SEQ ID NO: 47 (variable light chain sequence)

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCSSQSLNLSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDF
TLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGTKVEIK

[00350] SEQ ID NO: 48 (variable heavy chain sequence)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWGQGTILVTVSS

[00351] SEQ ID NO: 49 (variable light chain sequence)

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCSSQSLNLSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDF
TLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGAGTKVEIK

[00352] SEQ ID NO: 50 (variable light chain sequence)

EVQLVESGGGLVKPGGSRRLSCAASGFTTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTILVTVSS

[00353] SEQ ID NO: 51 (variable light chain sequence)

DIVMTQSPDSLAVSLGEKVTMNCSSQSLNLSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDF
TLTISSLQAEDLAVYYCQNDYTYPLTFGAGTKVEIK.

[00354] SEQ ID NO: 52 (variable light chain sequence)

DIVMTQSPDSLAVSLGEKVTINCKSSQSLNLSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDF
TLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGTKVEIK

[00355] SEQ ID NO: 53 (variable heavy chain sequence)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTILVTVSS

[00356] SEQ ID NO: 54 (variable light chain sequence)

QIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCSASSSVSYMLWFQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSL
QPEDFATYYCQRTFYPYTFGGGTKVEIK

[00357] SEQ ID NO: 55 (variable light chain sequence)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCSASSSVSYMLWFQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSL
QPEDFATYYCQRTFYPYTFGGGTKVEIK

[00358] SEQ ID NO:56 (variable light chain sequence)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASSSVSYMLWFQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL
QPEDFATYYCQQRITFYPTFGGGTKVEIK

[00359] SEQ ID NO:57 (variable heavy chain sequence)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQRPGQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTS
TVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTIYGYWGQGTILVTVSS.

[00360] SEQ ID NO:58 (variable heavy chain sequence)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAPGQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTS
TVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTIYGYWGQGTILVTVSS

[00361] SEQ ID NO:59 (variable heavy chain sequence)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQRPGQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKVTMTADTSTS
TVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTIYGYWGQGTILVTVSS.

[00362] SEQ ID NO:60 (variable heavy found sequence)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAPGQGLEWIGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTS
TVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTIYGYWGQGTILVTVSS

[00363] SEQ ID NO:61 (variable heavy sequence)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQAPGQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTS
TVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTIYGYWGQGTILVTVSS

[00364] SEQ ID NO:62 (variable heavy sequence):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQRPGQGLEWMGRIDPEDGDTKFAPKFQGKATMTADTSTS
TVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTIYGYWGQGTILVTVSS

[00365] SEQ ID NO:63 (variable heavy sequence)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQRPGQGLEWMGRIDPEDGDTKFAPKFQGKVTMTADTSTS
TVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTIYGYWGQGTILVTVSS

[00366] SEQ ID NO:64 (variable heavy sequence)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAPGQGLEWIGRIDPEDGDTKFAPKFQGKATMTADTSTS
TVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTIYGYWGQGTILVTVSS

[00367] SEQ ID NO:65 (variable heavy sequence)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAPGQGLEWMGRIDPEDGDTKFAPKFQGKATMTADTSTS
TVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTIYGYWGQGTILVTVSS

[00368] SEQ ID NO:66 (variable heavy sequence)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQAPGQGLEWMGRIDPEDGDTKFAPKFQGKATMTADTSTS
TVYMELSSLRSED TAVYYCTTSYYVGT YGYWGQGT LVT VSS

[00369] SEQ ID NO:67 (variable heavy sequence)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDYIIHWVKQRPKGLEWMGRIDPEDGDTKYDPKFQGRVTMTADTSTD
TAYMELSSLRSED TAVYYCTTSYYVGT YGYWGQGT TTVTVSS

[00370] SEQ ID NO:68 (variable heavy sequence)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIKDYIIHWVKQRPKGLEWMGRIDPEDGDTKYDPKFQGRVTMTADTSTD
TAYMELSSLRSED TAVYYCTTSYYVGT YGYWGQGT TTVTVSS

[00371] SEQ ID NO:69 (variable heavy sequence)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIKDYIIHWVKQRPKGLEWMGRIDPEDGDTKYDPKFQGKVTMTADTSTD
TAYMELSSLRSED TAVYYCTTSYYVGT YGYWGQGT TTVTVSS

[00372] SEQ ID NO:70 (variable heavy sequence)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIKDYIIHWVKQAPKGLEWMGRIDPEDGDTKYDPKFQGKATMTADTSTD
TAYMELSSLRSED TAVYYCTTSYYVGT YGYWGQGT TTVTVSS

[00373] SEQ ID NO:71 (variable heavy sequence)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIKDYIIHWVKQRPKGLEWMGRIDPEDGDTKYDPKFQGKATMTADTSTD
TAYMELSSLRSED TAVYYCTTSYYVGT YGYWGQGT TTVTVSS

[00374] SEQ ID NO:72 (variable heavy sequence)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIKDYIIHWVKQAPKGLEWIGRIDPEDGDTKYDPKFQGKATMTADTSTD
TAYMELSSLRSED TAVYYCTTSYYVGT YGYWGQGT TTVTVSS

[00375] SEQ ID NO:73 (variable heavy sequence)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDYIIHWVQAPKGLEWMGRIDPEDGDTKYDPKFQGRVTMTADTSTD
TAYMELSSLRSED TAVYYCTTSYYVGT YGYWGQGT TTVTVSS

[00376] SEQ ID NO:74 (variable light sequence) 1 from antibody 10F2Hum:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSATSSVS YILWFQ QKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL
QPEDFATYYCQQR TFYPYTFGGG TKVEIK

[00377] SEQ ID NO: 75 (variable light sequence) 2 from antibody 10F2Hum:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSATSSVS YILWFQ QKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISL
QPEDFATYYCQQR TFYPYTFGGG TKVEIK

[00378] SEQ ID NO: 76 (variable light sequence)

QIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCSATSSVSYILWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISL
QPEDFATYYCQQRIFYPYTFGGGTKVEIK

[00379] Exemplary humanized antibodies of the present invention are those that have the heavy and light chain sequences set forth in the following table. The bold underlined sequences in the following table are the variable domains whereas the normal, non-underlined sequences are the constant domains:

Identity	Sequence	SEQ ID NO:
Antibody A (Light Chain)	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTW</u> <u>HQOKPGQPPKLLIYWTSTRESGVDRFSGSGSGTDFTLTIS</u> <u>SLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGKVEIKR</u>TVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFPAKRVQWVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	26
Antibody A (Heavy Chain, IgG1K0)	<u>EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTTLTVSS</u>ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKCDKHTCTPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	27
Antibody A (Heavy Chain, IgG1)	<u>EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTTLTVSS</u>ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKCDKHTCTPPCPAPELLGGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	28
Antibody A (Heavy Chain, IgG4DM)	<u>EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTTLTVSS</u>ASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVN HKPSNTKVDKRVEPKGPPCPAPEFEGGPSVFLFPKPK KDTLMI SRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP	29

	SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
Antibody A (Heavy, IgG1KOb)	<u>EVQLVESGGGLVHPGGSRLSCAASGFTTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTLVTVSS</u> ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	30
Antibody B (Light Chain)	<u>DIVMTQSPDLSAVSLGEKVTINCKSSQSLNLSGNQKNYL</u> <u>TWHQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVDRFSGSGSGTDFT</u> <u>LTISLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGTKEIKR</u> TVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC	31
Antibody B (Heavy Chain, IgG1KO)	<u>EVQLVESGGGLVHPGGSRLSCAASGFTTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLLVTVSS</u> ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	32
Antibody B (Heavy Chain, IgG1)	<u>EVQLVESGGGLVHPGGSRLSCAASGFTTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLLVTVSS</u> ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	33
Antibody B (Heavy Chain, IgG4 DM)	<u>EVQLVESGGGLVHPGGSRLSCAASGFTTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLLVTVSS</u> ASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVEPKSGPPCPAPEFEGGPSVFLFPKPK KDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK	34

	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	
Antibody B (Heavy Chain, IgG1KOb)	<u>EVQLVESGGGLVQPKGGSLRLSCAASGFTTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLLTVVSS</u> ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	35
Antibody C (Light Chain)	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMLWFQ</u> <u>QKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTL</u> <u>TISSLQPEDFATYYCQORTFYPTFGGGTKVEIKRT</u> VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	36
Antibody C (Heavy Chain, IgG1KO)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED TAVYYCTTSYYVGTGYGYWGQGTLLTVVSS</u> ASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	37
Antibody C (Heavy Chain, IgG1)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED TAVYYCTTSYYVGTGYGYWGQGTLLTVVSS</u> ASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	38
Antibody C (Heavy Chain, IgG4 DM)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED TAVYYCTTSYYVGTGYGYWGQGTLLTVVSS</u> ASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDH KPSNTKVDKRVEPKSGYPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTV	39

	DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	
Antibody C (Heavy Chain, IgG1KOb)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQ GKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGLVTVSS</u> ASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	40

[00380] The variable regions were subcloned into one or two different suitable IgG expression vectors:

[00381] A) a human IgG1-KO (knock-out)/kappa format with a Leu234Ala, Leu235Ala double mutation in the Fc region to reduce effector function such as FcγR and complement binding

[00382] B) a human IgG4-DM (double mutant)/kappa format with a Ser228Pro mutation in the hinge region to reduce the occurrence of IgG4 half-molecules and a Leu235Glu mutation to further reduce FcγR binding

[00383] The two candidates Antibody A and Antibody B were purified and evaluated by the following criteria:

- Appearance of CCF (turbidity)
- Filtration properties of CCF
- Yield on rProteinA
- Turbidity upon elution and neutralization
- Soluble aggregates (SEC)
- Purity / contamination pattern (SDS)
- Charge pattern (IEF)

[00384] **Example 2: *In vitro* data**

[00385] Antibody A, Antibody B and Antibody C were characterized along with antibodies 4D11 (Kirin/ Astellas) and PG-102 (PanGenetics) which were produced based on published sequences. Data for Antibody A, Antibody B, Antibody C and 4D11 are shown below. PG-102 displayed agonistic activity and only incomplete inhibition of

B cell proliferation (not shown). Table 2.2. summarizes the data obtained. A more detailed description of the data follows the Table 2.2.

Table 2.2. Summary of *in vitro* data of Antibody A, Antibody B and Antibody C and Kirin's 4D11 anti-CD40 antibody.

Parameter/Assay	Antibody A	Antibody B	Antibody C	4D11
Kd +/- hu. Serum	<100 pM	<100pM	<100pM	<100pM
Cell binding (EC50/nM $\pm$ SD)	1.2 ($\pm$ 0.28)	1.5 ($\pm$ 0.68)	1.7 ($\pm$ 0.28)	0.9 ($\pm$ 0.3)
B cell proliferation:Antagonism (IC50/nM $\pm$ SD)	0.3 ($\pm$ 0.13)	0.2 ($\pm$ 0.10)	0.1 ($\pm$ 0.004)	0.03 ($\pm$ 0.02)
B cell proliferation:Agonism (SI*) (IC50/nM $\pm$ SD)	No Agonism (SI <2)	No Agonism (SI <2)	No Agonism (SI <2)	No Agonism (SI <2)
Dendritic cells/IL-12/23p40 Antagonism (IC50/nM $\pm$ SD)	< 1nM	< 1nM	< 1nM	< 1nM
Dendritic cells/IL-12/23p40 Agonism	No agonism	No agonism	No agonism	No agonism
Species cross-react.: Hu/Cyno Binding (EC50 ratios**)	3	2	1	Not tested

* SI, Stimulation Index; ** Ratio > 1 means increased binding to Cyno compared to Human

[00386] A. Binding of humanized antibodies to cellular CD40 and recombinant CD40 protein

[00387] The specific binding of humanized antibodies to cellular CD40 was analyzed by flow cytometry using human CD40-transfected HEK293 cells. Concentration-dependent binding of Antibody A, Antibody B, and Antibody C was observed. The antibodies displayed a similar binding profile shown in Figure 1B. EC50 values of the antibodies of the present invention and Kirin's antibody 4D11 are all in the same range of ~1 nM which is most likely at the sensitivity limit of the assay due to

the high levels of CD40 in the transfected cells. The specific binding of humanized antibodies to cellular CD40 on human Ramos cells also demonstrated concentration-dependent binding. The antibodies displayed a slightly different binding profiles (shown in Figure 2) and EC50 values between 0.21-1.22 nM. No binding was detected on CD40 negative cells such as non-transfected HEK293 cells or the T cell line HSB-2 thus confirming selective binding to CD40 (data not shown).

[00388] The affinity of Antibody A, Antibody B and Antibody C binding to human CD40-Fc protein was measured via ForteBio Octet and revealed dissociation constants (K_D) of <100 pM. Due to antibody and CD40-Fc bivalency avidity effects prevent K_D s below 100 pM from being determined accurately. In addition, the binding to CD40-Fc was analyzed in the absence and presence of 50% human serum and no significant effect of serum on binding was observed (data not shown)

[00389] B. Activity of humanized antibodies in B cell activation/ proliferation assays

[00390] The activity of humanized antibodies was tested in a B cell proliferation assay in which human B cells derived from peripheral blood are stimulated with recombinant CD40L in the presence of IL-2 and IL-4. Antibody A, Antibody B and Antibody C showed potent inhibition of the proliferation of B cells (shown in Figures 3A and 3B). Comparison to inhibition curves and IC50 values of BI's antibodies and Kirin's antibody 4D11, indicates the 4D11 antibody to have higher potency (Figure 3B and 4) when tested across multiple donors. When tested for agonistic activity in the absence of CD40L, antibodies, Antibody B Antibody A and Antibody C did not induce any B cell proliferation above background levels at concentrations up to 10 μ g/ml (67 nM) (shown in Figure 4) similar to the 4D11 antibody.

[00391] The competitor antibody 4D11 appeared to be slightly more potent with an average IC50 of ~0.02 nM and absence of agonistic effects. Data for the three BI antibodies and 4D11 are summarized in Figure 4 and Table 2.2 above. Another competitor antibody, PG-102 (derived from clone 5D12), also tested in this assay, displayed significant agonist effects stimulating B cell proliferation in the absence of

CD40L (Figure 4). Therefore, the lack of agonistic activity of our lead candidates clearly differentiates them from PG-102.

[00392] In a second assay the antibodies were assessed for inhibition of CD86 up-regulation in human B cells. In this instance, the assay can be performed with human whole blood or in purified B cells, both in the presence of exogenous CD40L. In agreement with the B cell proliferation data, Antibody B Antibody A and Antibody C tested in human whole blood showed potent inhibition of CD40-mediated CD86 up-regulation as measured by flow cytometry (shown in Figure 5). Antibody C displayed similar potency to 4D11 in this assay while the potency of Antibody B and Antibody A were somewhat weaker. Comparison of Antibody B and 4D11 on purified B cells or in whole blood, shows that the potency of Antibody B (IC₅₀ and IC₉₀ values) are relatively unchanged for purified B cells compared to B cells in the presence of other CD40 bearing cells or serum, while 4D11 undergoes a dramatic shift in potency in the whole blood conditions (shown in Figure 6).

[00393] Similar data has been developed when Antibody B Antibody A and Antibody C were assessed for inhibition of CD86 up-regulation on cynomolgus monkey B cells when performed with whole blood samples (shown in Figure 7). Antibody B Antibody A and Antibody C tested in cynomolgus monkey whole blood showed potent inhibition of CD40-mediated CD86 up-regulation as measured by flow cytometry. These antibodies therefore all show functional cross-reactivity to cynomolgus monkey CD40 with similar potency to human CD40.

[00394] The activity of Antibody B IgG1KOb and Antibody B IgG1WT were assessed for ability to mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity (Figure 13). In this assay RAMOS cells were incubated with human PBMCs at an effector to target cell ratio of 50:1. Antibody B IgG1KOb and Antibody B IgG1WT were titrated from 20 ug/ml and the extent of cell death is monitored by release of LDH. The data shown are from one representative experiment. The data show that Antibody A IgG1Wt 20E2-12-RIgG1WT is an effective mediator of ADCC and that Antibody B IgG1KOb containing the mutations eliminating effector function does not have ADCC activity.

[00395] Example 3: Pharmacokinetic/ Pharmacodynamic Studies

[00396] A. Single dose IV Administration of Antibody A and Antibody B at 1 or 10 mg/kg in Cynomolgus Monkeys

[00397] Antibody A and Antibody B were each dosed at 1 and 10 mg/kg IV to male, cynomolgus monkeys (N=3)/dose. Blood samples were collected from 0-504 hr (3 weeks), serum was recovered, and samples were stored at -20°C until analysis. The samples were analyzed by sandwich ELISA as described above. The serum concentration-time profiles of both antibodies in monkeys after both IV doses and the pharmacokinetic parameters are summarized in Figure 8 and Tables 2.7.1 (Antibody A) and 2.7.2 (Antibody B) shown below. Both antibodies showed dose-dependent pharmacokinetics suggesting that at low dose, clearance is predominantly attributable to consistent with target-mediated disposition whereas at higher dose the antibody is cleared primarily by catabolism. Similar dose-dependent pharmacokinetic profiles have been observed for other MAbs targeting membrane-associated targets (e.g. CD19, CD20, EGFR, CD146 and HER2). Clearance for Antibody A was 0.8 and 0.1 mL/h/kg for the 1 and 10 mg/kg doses, respectively. Clearance for Antibody B was 0.7 and 0.1 mL/hr/kg for the 1 and 10 mg/kg doses, respectively. Similarly, Antibody A half-life was 1 and 13 days for the 1 and 10 mg/kg doses, respectively and Antibody B half-life was 2 and 13 days for the same respective doses. Although Antibody B had a marginally longer half-life at the lower dose relative to the same dose for Antibody A, this difference would not be expected to translate into more sustained exposure upon chronic administration. AUC for both compounds was supraproportional and volume of distribution (V_{ss}) for both compounds approximated that of plasma volume (~40 mL/kg) exhibiting the limited tissue distribution typically seen for large, polar protein therapeutics. Overall, there were no appreciable differences in pharmacokinetic parameters between the two antibodies.

Table 2.7.1: Pharmacokinetic parameters of Antibody A in male, cynomolgus monkeys (N=3)/dose after single 1 and 10 mg/kg IV doses.

Dose (mg/kg)	CLp (mL/hr/kg)	Vss (mL/kg)	AUC (μM.hr)	T1/2 (days)	MRT (days)
1	0.8 ± 0.03	41 ± 6	8.0 ± 0.3	0.9 ± 0.2	2.1 ± 0.2
10	0.10 ± 0.02	42 ± 6	660 ± 92	12.6 ± 0.5	17.5 ± 0.3

Table 2.7.2: Pharmacokinetic parameters of Antibody B in male, cynomolgus monkeys (N=3)/dose after single 1 and 10 mg/kg IV doses.

Dose (mg/kg)	CLp (mL/hr/kg)	Vss (mL/kg)	AUC (μM.hr)	T1/2 (days)	MRT (days)
1	0.7 ± 0.16	40 ± 2	10.1 ± 2.7	1.5 ± 0.2	2.6 ± 0.8
10	0.09 ± 0.01	41 ± 6	744 ± 55	13.3 ± 3.0	19.3 ± 4.2

[00398] B. Ex vivo Pharmacodynamic Study

[00399] As part of the PK study described above we analyzed the pharmacodynamic effects of anti-CD40 antibodies. To this end whole blood samples were incubated with recombinant CD40L overnight and the increase of CD86 expression on B cells was determined by flow cytometry. Samples were analyzed at day 0 (pre-treatment), day 2, 7 and 14 after dosing. Although the increase in CD86 expression is relatively small (~5-20-%) a dose-dependent effect was observed (shown in Figure 9). In the group of animals dosed with 10 mg/kg of Antibody A and Antibody B, the CD86 induction was completely inhibited at 2, 7 and 14 days consistent with the sustained exposure at this dose. Animals dosed with 1 mg/kg showed complete inhibition at day 2, partial inhibition at day 7 and no inhibition at day 14. The loss of the pharmacodynamic effect over time correlates with the faster clearance of the antibody in the low dose group.

[00400] Example 4: Toxicology related studies: CD40 on platelets

[00401] CD40 is constitutively expressed on human platelets (Henn, et al., 2001) and (Inwald, et al., 2003), while CD40L is rapidly and transiently expressed on the cell surface of activated platelets (Henn, et al., 2001). While anti-CD40 antibodies without FcγR binding would not be expected to have effects on platelets, it is important to

directly demonstrate that this is the case. Flow cytometry studies were performed to demonstrate the binding of anti-CD40 lead candidates to human and cynomolgus platelets.

[00402] Previously it has been demonstrated by flow cytometry that the G28.5 and mAb 89 anti-CD40 mAb bind to resting human platelets (Henn, et al., 2001). This was confirmed using FITC-labeled G28.5 antibody. 5-fold serial dilutions of G28.5 were prepared and a range of 0.5 µg/ml to 0.32ng/ml was incubated in a 100 µl of platelets obtained from humans (2 donors) or cynomolgus monkeys (3 donors) for 30 minutes at room temperature. In addition, APC-labeled anti-CD45 mAb was used to identify platelets bound to other CD40⁺ cell types so as to exclude these cells from analysis. After antibody staining, the platelets were washed and fixed with Optilyse C and flow cytometry was performed. The mean fluorescence intensity (MFI) was determined as a measure of antibody binding to CD45⁺ platelets.

[00403] Commercially available 5c3 and selected antibodies of the invention anti-CD40 mouse mAb were FITC-labeled. Binding to Ramos cells was confirmed. The number of FITC molecules per antibody molecule ranged from 2 to 4 FITC per antibody molecule. Five-fold serial dilutions of commercial and candidate annti-CD40 mAb were prepared ranging from 0.5 µg/ml to 0.32 ng/ml and incubated with human (3 donors) and cynomolgus (2 donors) platelet for 30 minutes at room temperature.

[00404] A representative graph demonstrating the binding of the mouse candidate anti-CD40 mAb to human platelets is shown in Figure 11. The four candidate monoclonal antibodies displayed specific binding to human platelets compared to the FITC-labeled isotype control antibody. 10F2, 2H11, 19B10 and 20E2 demonstrated comparable binding to platelets. A similar trend was observed for cynomolgus platelets (data not shown).

[00405] In addition to these studies, directly labeled Antibody B and 4D11 were compared for the ability to bind platelets and B cells in human and cynomolgus monkey whole blood samples (shown in Figure 12). 4D11 displayed similar binding (as exemplified by EC50) to both B cells and platelets in the human and cynomolgus

monkey blood samples. Antibody B showed a similar pattern but with much weaker binding potency.

[00406] Example 5: In vivo pharmacology studies in the NSG mouse model

[00407] The efficacy of the humanized antibodies, Antibody A, was evaluated in an antibody production model where human PBMC's were injected into immunodeficient NSG mice in order to generate a graft vs. host response. Significant production of human IgM (hIgM) and IgG (hIgG) can be detected beginning 2 weeks following engraftment. Treatment with Antibody A at doses of 5 and 1 mg/kg significantly inhibited the hIgG and hIgM response at weeks 2 and 3 following engraftment. A comparator antibody (4D11) was evaluated at a single 5 mg/kg dose and also demonstrated abrogation of the response. In a second study all antibodies Antibody A, Antibody B and Antibody C were tested at a single dose of 1 mg/kg and showed complete inhibition of the IgM and IgG response at week 2 (Figure 10).

[00408] Example 6: Biomarker analysis

[00409] Receptor up-regulation: CD40L-induced up-regulation of receptors can be measured by flow cytometry. Human whole blood can be stimulated with optimized concentration of soluble CD40L and the full percentage of CD20+Receptor+ cells can be measured by flow cytometry. The change in percentage of CD86 expression on CD20 positive cells was measured in parallel to the cynomolgous pk study assessing Antibodies A and B (Figure 9). The data shows inhibition of CD86 up regulation at time points consistent with the exposure of the antibodies.

[00410] Targeted proteomics: The increased secretion of proteins upon CD40 stimulation in whole blood can be used as potential biomarker(s). An optimized concentration of soluble CD40L and stimulation time were established using Luminex multiplex beads platform detecting MDC/CCL22 and several other secreted proteins. Clinical samples will be assessed from human whole blood in full dose range of anti-CD40 mAb.

[00411] Receptor occupancy: CD40 receptor occupancy can be determined in an *in vitro* or *ex vivo* assay based on flow cytometric analysis of B cells in human whole

blood. Current candidates Antibody of the instant in invention and non-competing anti-CD40 antibody 5C3 will be used to quantitate receptor occupancy assay.

[00412] Example 7: Anti-Tumor Activity of Humanized Anti-CD40 Antibody

[00413] In some instances it may be desirable to determine the antitumor properties of the antibodies of the present invention. Such a determination may be made by assaying the antitumor activity of the humanized anti-CD40 antibody in a SCID mouse lymphoma xenograph model. Such a SCID model can be injected with cancer cells to present a tumor, e.g., 5×10^6 million tumor cells can be injected subcutaneously into SCID mice (10/group) thirteen days prior to starting drug treatment. Murine anti-CD40 antibodies of the present invention or an comparison (e.g., control or other humanized antibody) is given intra-peritoneally 3 times per week (4 mg/kg/dose) with 8 or 5 doses administered. The development and growth of tumors are monitored in the mouse and tumor volume may be measured weekly during the selected study period, e.g., 14-day study period. Preferably the results will show a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 or more fold increase in the growth of tumors in control mice as compared to the mice treated with the antibodies of the present invention. Preferably, over the treatment period, tumor growth in mice treated with the antibodies of the invention will be negligible. Such data can corroborate that the humanized antibody being tested is effective in suppressing tumor growth in this B lymphoma xenograph model.

[00414] Example 8: Prolonged Survival by Humanized Anti-CD40 Antibody

[00415] The efficacy of the humanized anti-CD40 antibody on survival of tumor-bearing mice such as those described above can be assayed in a SCID mouse lymphoma xenograph model. SCID mice (10/group) are inoculated intravenously with 1×10^6 million tumor cells three days prior to antibody treatment. Mice are then treated with the murine or humanized anti-CD40 antibodies of the present invention or an Ig control, administered intraperitoneally two times per week (4 mg/kg/dose) for a total of five doses. The mouse cages can then be examined daily for mortality to determine the level of efficacy of the antibodies in prolonging survival of a subject having cancer.

[00416] Various references, including patent applications, patents, and scientific publications, are cited herein, the disclosures of which are incorporated herein by

reference in their entireties. Citation or identification of any reference herein shall not be construed as an admission that such reference is available as prior art to the present invention.

[00417] Preferred aspects of the present invention may be described according the embodiments in the following paragraphs:

[00418] Paragraph 1. A humanized monoclonal antibody wherein said antibody specifically binds to human CD40 having an antagonistic activity IC₅₀ of less than 1nM and has no agonism up to 100 µg/ml in B cell proliferation and wherein said antibody is further characterized in that the antibody has an in vivo half life in non-human primates that is at least 10 days.

[00419] Paragraph 2. The humanized monoclonal antibody of Paragraph 1 wherein said antibody has a half-life in cynomolgus monkeys of greater than 8 days at a dose of less than 30 mg/kg.

[00420] Paragraph 3. The antibody of Paragraph 1, wherein the antibody comprises a heavy chain sequence selected from the group consisting of any of SEQ ID NO:1 to SEQ ID NO:4 and a light chain sequence selected from the group consisting of any of SEQ ID NO:5 to SEQ ID NO:8.

[00421] Paragraph 4. The antibody of Paragraph 1, wherein said antibody is a humanized antibody or antigen binding fragment of an antibody having the heavy chain variable region amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 1 to 4, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO. 50, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, or SEQ ID NO: 73.

[00422] Paragraph 5. The antibody of Paragraph 1, wherein said antibody is a humanized antibody or antigen binding fragment of an antibody that comprises a light

chain variable domain amino acid sequence of SEQ ID NO: 5 to SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, or SEQ ID NO:76.

[00423] Paragraph 6. The monoclonal antibody of Paragraph 1, wherein said antibody comprises a heavy chain and a light chain, wherein the heavy chain CDR1 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 9 through SEQ ID NO:11, a heavy chain CDR2 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:12 through SEQ ID NO:15 and a heavy chain CDR3 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:16 through SEQ ID NO:17; and wherein the light chain CDR1 sequence has a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:18 through SEQ ID NO:21, a light chain CDR2 sequence of SEQ ID NO:22 through SEQ ID NO:23 and a light chain CDR3 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:24 through SEQ ID NO:25.

[00424] Paragraph 7. The monoclonal antibody of Paragraph 1, wherein said antibody comprises a heavy chain CDR1 sequence of SEQ ID NO: 10, a heavy chain CDR2 sequence of SEQ ID NO:13 and a heavy chain CDR3 sequence of SEQ ID NO:16 and wherein said antibody comprises a light chain CDR1 sequence of SEQ ID NO:19, a light chain CDR2 sequence of SEQ ID NO:22 and a light chain CDR3 sequence of SEQ ID NO:24.

[00425] Paragraph 8. The monoclonal antibody of Paragraph 1, wherein said antibody comprises a heavy chain CDR1 sequence of SEQ ID NO: 9, a heavy chain CDR2 sequence of SEQ ID NO:14 and a heavy chain CDR3 sequence of SEQ ID NO:16 and wherein said antibody comprises a light chain CDR1 sequence of SEQ ID NO:20, a light chain CDR2 sequence of SEQ ID NO:22 and a light chain CDR3 sequence of SEQ ID NO:24.

[00426] Paragraph 9. An anti-CD40 antibody comprising a heavy chain variable domain sequence of any one of SEQ ID NOs:1 to 4.

[00427] Paragraph 10. An anti-CD40 antibody comprising an light chain variable domain sequence of any one of SEQ ID NOs: 5 to SEQ ID NO:8.

[00428] Paragraph 12. A humanized antibody or antibody fragment having a heavy chain variable domain and a light chain variable region comprising the amino acid sequences of SEQ ID NO:27 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:28 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:29 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:30 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:32 and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:33 and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:34 and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:35 and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:37 and SEQ ID NO:36, respectively; SEQ ID NO:38 and SEQ ID NO:36, respectively; SEQ ID NO:39 and SEQ ID NO:36, respectively; SEQ ID NO:40 and SEQ ID NO: 36, respectively.

[00429] Paragraph 13. An isolated antibody or antigen-binding fragment that specifically binds to human CD40, comprising a humanized heavy chain variable domain comprising a framework region having an amino acid sequence at least 90% identical to the amino acid sequence of the framework region of the human variable domain heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29 or SEQ ID NO:30, and comprising a light chain amino acid sequence at least 90% identical to a corresponding light chain variable domain of SEQ ID NO:26.

[00430] Paragraph 14. An isolated antibody or antigen-binding fragment that specifically binds to human CD40, comprising a humanized heavy chain variable domain comprising a framework region having an amino acid sequence at least 90% identical to the amino acid sequence of the framework region of the human variable domain heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34 or SEQ ID NO:35, and comprising a light chain amino acid sequence at least 90% identical to a corresponding light chain variable of SEQ ID NO:31.

[00431] Paragraph 15. An isolated antibody or antigen-binding fragment that specifically binds to human CD40, comprising a humanized heavy chain variable domain comprising a framework region having an amino acid sequence at least 90% identical to the amino acid sequence of the framework region of the human variable domain heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO:38; SEQ ID

NO:39 or SEQ ID NO: 40, and comprising a light chain amino acid sequence at least 90% identical to a corresponding light chain of SEQ ID NO:36.

[00432] Paragraph 16. The antibody of Paragraph 1, wherein said antibodies fail to stimulate production of cytokines from B cells in that absence of CD40L.

[00433] Paragraph 17. The antibody of Paragraph 1, wherein said antibodies bind to human CD40 in the presence of 50% human serum with a reduction of on rate less than two fold.

[00434] Paragraph 18. The antibody of Paragraph 1, wherein said antibody produces inhibition of IgM and IgG production in a mammal at a concentration of 1 mg/kg.

[00435] Paragraph 19. A method of blocking the function of human CD40 in a mammal comprising administering to said mammal a composition comprising an antibody of Paragraph 1 in an amount sufficient to block a CD40 mediated immune response in said mammal.

[00436] Paragraph 20. A method of treating or ameliorating graft vs host disease in a mammal comprising administering to said mammal a composition comprising an antibody of Paragraph 1 in an amount sufficient to decrease one or more of the symptoms of graft vs. host disease in said animal.

[00437] Paragraph 21. The method of Paragraph 20, wherein said mammal has an autoimmune or inflammatory disease selected from the group consisting of rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, proliferative lupus glomerulonephritis, inflammatory bowel disease (IBD), psoriasis, idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP), Crohn's Disease and systemic lupus erythematosus (SLE), Hashimoto's thyroiditis, primary myxoedema, thyrotoxicosis/Graves disease, pernicious anaemia, autoimmune atrophic gastritis, autoimmune carditis, Addison's disease, premature menopause, type 1-diabetes mellitus, Good pasture's syndrome, myasthenia gravis, autoimmune haemolytic anaemia, idiopathic leucopenia, primary biliary cirrhosis, active chronic hepatitis (HBs Ag negative), cryptogenic cirrhosis, Sjogren's syndrome,

dermatomyositis, scleroderma, mixed tissues connective disease, discoid lupus erythematosus, and systemic vasculitis.

[00438] Paragraph 22. The method of Paragraph 19, wherein said mammal has rheumatoid arthritis.

[00439] Paragraph 23. The method of Paragraph 20, further comprising administering a second therapeutic agent selected from the group consisting of a TNF-antagonist, a disease-modifying antirheumatic drug, a CTLA4-antagonist, an anti-IL-6 receptor mAb and an anti-CD20 mAb.

[00440] Paragraph 24. A method according to Paragraph 20, wherein said inflammatory disease or autoimmune disease is an inflammatory disease or autoimmune disease that is associated with cells expressing both CD40 and CD20.

[00441] Paragraph 25. The method of Paragraph 19, wherein said anti-CD40 antibody is administered by a parenteral route of administration.

[00442] Paragraph 26. The method of Paragraph 19, wherein said anti-CD40 antibody is administered intravenously or subcutaneously.

[00443] Paragraph 27. A method of inhibiting antibody production by B cells in a human patient comprising administering to said human patient an effective amount of an anti-CD40 antibody of Paragraph 1.

[00444] Paragraph 28. The method of Paragraph 27, wherein said human patient has an inflammatory disease or autoimmune disease that is associated with CD40-expressing cells.

[00445] Paragraph 29. The method of Paragraph 27, wherein said human patient is suffering from an autoimmune disease selected from the group consisting of autoimmune or inflammatory disease selected from the group consisting of rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, proliferative lupus glomerulonephritis, inflammatory bowel disease (IBD), psoriasis, idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP), Crohn's Disease and systemic lupus erythematosus (SLE), Hashimoto's thyroiditis, primary myxoedema, thyrotoxicosis/Graves disease, pernicious anaemia, autoimmune atrophic gastritis, autoimmune carditis, Addison's disease, premature menopause, type 1-diabetes

mellitus, Good pasture's syndrome, myasthenia gravis, autoimmune haemolytic anaemia, idiopathic leucopenia, primary biliary cirrhosis, active chronic hepatitis (HBs Ag negative), cryptogenic cirrhosis, Sjogren's syndrome, dermatomyositis, scleroderma, mixed tissues connective disease, discoid lupus erythematosus, and systemic vasculitis.

[00446] Paragraph 30. A method for inhibiting the growth of cells expressing human CD40 antigen, comprising administering the antibody or antigen-binding fragment of Paragraph 1 to the cells, which antibody or antigen-binding fragment specifically binds to the human cell surface CD40 antigen, wherein the binding of the antibody or antigen-binding fragment to the CD40 antigen inhibits the growth or differentiation of the cells.

[00447] Paragraph 31. A method for treating a subject having a CD40-associated disorder, comprising administering to the subject the antibody or antigen-binding fragment of Paragraph 1, which antibody or antigen-binding fragment specifically binds to human CD40, wherein the binding of the antibody or antigen-binding fragment to CD40 inhibits the growth or differentiation of cells of the CD40-associated disorder.

[00448] Paragraph 32. The method of Paragraph 31, wherein the cells of the CD40-associated disorder are B lymphoblastoid cells, pancreatic, lung cells, breast cells, ovarian cells, colon cells, prostate cells, skin cells, head and neck cells, bladder cells, bone cells or kidney cells.

[00449] Paragraph 33. The method of Paragraph 31, wherein the CD40-associated disorder is chronic lymphocytic leukemia, Burkitt's lymphoma, multiple myeloma, a T cell lymphoma, Non-Hodgkin's Lymphoma, Hodgkin's Disease, Waldenstrom's macroglobulinemia or Kaposi's sarcoma.

[00450] Paragraph 34. A method for inducing depletion of peripheral B cells, comprising administering to the cells the antibody or antigen-binding fragment of Paragraph 1, which antibody or antigen-binding fragment specifically binds to a human cell surface CD40 antigen, wherein the binding of the antibody or antigen-binding fragment to the CD40 antigen induces depletion of the cells.

[00451] Paragraph 35. The method of Paragraph 34, wherein the antibody or antigen-binding fragment is administered to a subject having an immune disorder.

[00452] Paragraph 36. The method of Paragraph 34, wherein the immune disorder is rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus.

[00453] Paragraph 37. A method of treating rheumatoid arthritis in a subject comprising administering to said subject an antibody of Paragraph 1, wherein said antibody is an antagonistic antibody that blocks the function of CD40 in said subject.

[00454] Paragraph 38. The method of Paragraph 37, wherein said antibody is administered in an amount effective to inhibit B cell differentiation and antibody isotype switching in said subject.

[00455] Paragraph 39. The method of Paragraph 37, wherein said antibody is administered in an amount effective to inhibit cytokine and chemokine production and up-regulation of adhesion molecules in T-cells and macrophages in said subject.

[00456] Paragraph 40. The method of Paragraph 37, wherein said antibody is administered in an amount effective to inhibit activation of dendritic cells in said subject.

[00457] Paragraph 41. The method of Paragraph 37, wherein said antibody is administered in an amount effective to inhibit production of proinflammatory cytokines, chemokines, matrix metalloproteinases, prostaglandins, and down-regulate adhesion molecules in non-immune cells in said subject.

[00458] Paragraph 42. The method of Paragraph 37, wherein said antibody is administered in combination with a regimen comprising methotrexate administration and/or administration of Enbrel/Humira.

[00459] Paragraph 43. The method of Paragraph 37, wherein said subject is a subject that has rheumatoid arthritis and has been non-responsive to methotrexate treatment alone.

[00460] Paragraph 44. The method of Paragraph 43, wherein said method comprises treating said subject with a regimen comprising methotrexate administration and/or administration of Enbrel/Humira.

[00461] Paragraph 45. The method of Paragraph 37, wherein treatment of said subject with said antagonistic anti-CD40 antibody has a superior efficacy to treatment with methotrexate alone, Enbrel alone, a combination of Enbrel+methotrexate.

[00462] Paragraph 46. The method of Paragraph 43, wherein treatment of said subject with said antagonistic anti-CD40 antibody has a superior efficacy to treatment with Enbrel +MTX in patients who have had an inadequate response to methotrexate.

[00463] Paragraph 47. The method of Paragraph 37, wherein said antibody is administered in combination with a regimen comprising an anti-TNF agent.

[00464] Paragraph 48. The method of Paragraph 37, wherein said subject is a subject that has rheumatoid arthritis and has been non-responsive to treatment with an anti-TNF agent alone.

[00465] Paragraph 49. The method of Paragraph 48 wherein said method comprises treating said subject with a regimen comprising treatment with an anti-TNF agent in combination with said antagonistic anti-CD40 antibody.

[00466] Paragraph 50. The method of Paragraph 37, wherein treatment of said subject with said antagonistic anti-CD40 antibody has a superior efficacy to treatment with an anti-TNF agent.

[00467] Paragraph 51. The method of Paragraph 48, wherein treatment of said subject with said antagonistic anti-CD40 antibody has a superior efficacy to treatment with Orencia or Rituxan in patients who have had an inadequate response to an anti-TNF agent alone.

[00468] Paragraph 52. A pharmaceutical composition comprising:(i) the antibody or antigen-binding fragment of Paragraph 8; and(ii) a pharmaceutically acceptable excipient.

[00469] Paragraph 53. A pharmaceutical composition of Paragraph 52 wherein said antibody or antigen binding fragment thereof is conjugated to a second agent.

[00470] Paragraph 54. The pharmaceutical composition of Paragraph 52 wherein said second agent is a cytotoxic agent, a PEG-carrier, an enzyme or a marker.

[00471] Paragraph 55. An isolated polynucleotide encoding a heavy chain variable region amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 1 to 4, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID. NO. 50, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, or SEQ ID NO: 73.

[00472] Paragraph 56. An isolated polynucleotide encoding a light chain variable region amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 5 to SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, or SEQ ID NO:76.

[00473] Paragraph 57. A use of an antibody of Paragraph 1 in the manufacture of a medicament for blocking the function of human CD40 in a mammal wherein the medicament blocks a CD40 mediated immune response in said mammal.

[00474] Paragraph 58. A use of an antibody of Paragraph 1 for the manufacture of a medicament for treating or ameliorating graft vs host disease in a mammal.

[00475] Paragraph 59. The use of Paragraph 58, wherein said medicament is manufactured for the treatment of an autoimmune or inflammatory disease selected from the group consisting of rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, proliferative lupus glomerulonephritis, inflammatory bowel disease (IBD), psoriasis, idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP), Crohn's Disease and systemic lupus erythematosus (SLE), Hashimoto's thyroiditis, primary myxoedema, thyrotoxicosis/Graves disease, pernicious anaemia, autoimmune atrophic gastritis, autoimmune carditis, Addison's

disease, premature menopause, type 1-diabetes mellitus, Good pasture's syndrome, myasthenia gravis, autoimmune haemolytic anaemia, idiopathic leucopenia, primary biliary cirrhosis, active chronic hepatitis (HBs Ag negative), cryptogenic cirrhosis, Sjogren's syndrome, dermatomyositis, scleroderma, mixed tissues connective disease, discoid lupus erythematosus, and systemic vasculitis.

[00476] Paragraph 60. A use according to Paragraph 58 wherein said medicament further comprises a second therapeutic agent selected from the group consisting of a TNF-antagonist, a disease-modifying antirheumatic drug, a CTLA4-antagonist, an anti-IL-6 receptor mAb and an anti-CD20 mAb.

[00477] Paragraph 61. A use according to Paragraph 57 wherein said medicament is manufactured for use a parenteral route of administration.

[00478] Paragraph 62. A use according to Paragraph 57 wherein said medicament is manufactured for use intravenously or subcutaneously.

[00479] Paragraph 63. A use of an antibody of Paragraph 1 in the manufacture of a medicament for the inhibition of antibody production by B cells in a human patient.

[00480] Paragraph 64. A use of an antibody of Paragraph 1 for the manufacture of a medicament for inhibiting the growth and/or differentiation of cells expressing human CD40 antigen.

[00481] Paragraph 65. A use of an antibody of Paragraph 1 for the manufacture of a medicament for the treatment of a subject having a CD40-associated disorder wherein the binding of the antibody or antigen-binding fragment in said medicament to CD40 inhibits the growth or differentiation of cells of the CD40-associated disorder.

[00482] Paragraph 66. A use according to Paragraph 65, wherein the medicament is used for the treatment of cells of a CD40-associated disorder selected from B lymphoblastoid cells, pancreatic, lung cells, breast cells, ovarian cells, colon cells, prostate cells, skin cells, head and neck cells, bladder cells, bone cells or kidney cells.

[00483] Paragraph 67. The use according of Paragraph 65, wherein the medicament is used for the treatment of chronic lymphocytic leukemia, Burkitt's lymphoma, multiple myeloma, a T cell lymphoma, Non-Hodgkin's Lymphoma, Hodgkin's Disease, Waldenstrom's macroglobulinemia or Kaposi's sarcoma.

[00484] Paragraph 68. A use of an antibody of Paragraph 1 in the manufacture of a medicament for inducing depletion of peripheral B cells wherein the antibody or antigen-binding fragment of the medicament specifically binds to a human cell surface CD40 antigen, wherein the binding of the antibody or antigen-binding fragment to the CD40 antigen induces depletion of the cells.

[00485] Paragraph 69. The use according to Paragraph 68, wherein the medicament is for the treatment of a subject having an immune disorder.

[00486] Paragraph 70. The use according to Paragraph 68, wherein the medicament is for the treatment of rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus.

[00487] Paragraph 71. A use of an antibody of Paragraph 1 for the manufacture of a medicament for the treatment of rheumatoid arthritis in a subject.

[00488] Paragraph 72. The use according to Paragraph 71, wherein the medicament is for the inhibition of B cell differentiation and antibody isotype switching in said subject.

[00489] Paragraph 73. The use according to Paragraph 71, wherein the medicament is for the inhibition of cytokine and chemokine production and up-regulation of adhesion molecules in T-cells and macrophages in said subject.

[00490] Paragraph 74. The use according to Paragraph 71 wherein the medicament is for the inhibition of activation of dendritic cells in said subject.

[00491] Paragraph 75. The use according to Paragraph 71 wherein the medicament is for the inhibition of production of proinflammatory cytokines, chemokines, matrix metalloproteinases, prostaglandins, and down-regulation of adhesion molecules in non-immune cells in said subject.

[00492] Paragraph 76. The use according to Paragraph 71, wherein the medicament is a combination medicament to be administered in combination with a regimen comprising methotrexate administration and/or administration of Enbrel/Humira.

[00493] Paragraph 77. The use according to Paragraph 71, wherein the medicament further comprises an anti-TNF agent.

[00494] The application of the teachings disclosed herein is not to be limited in scope by the specific embodiments described herein. Indeed, various modifications will be within the capabilities of one having ordinary skill in the art in light of the teachings contained herein and accompanying examples. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims.

CLAIMS

1. A humanized antibody, wherein said antibody comprises a heavy chain and a light chain, wherein the heavy chain sequence and light chain sequence are selected from the group consisting of:

a) a heavy chain CDR1 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 9 through SEQ ID NO:11, a heavy chain CDR2 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:12 through SEQ ID NO:15, and a heavy chain CDR3 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:16 through SEQ ID NO:17; and

b) the light chain CDR1 sequence has a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:18 through SEQ ID NO:21, a light chain CDR2 sequence of SEQ ID NO:22 through SEQ ID NO:23, and a light chain CDR3 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:24 through SEQ ID NO:25.

2. The antibody of claim 1, wherein said antibody comprises a heavy chain CDR1 sequence of SEQ ID NO: 10, a heavy chain CDR2 sequence of SEQ ID NO:13 and a heavy chain CDR3 sequence of SEQ ID NO:16; and wherein said antibody comprises a light chain CDR1 sequence of SEQ ID NO:19, a light chain CDR2 sequence of SEQ ID NO:22 and a light chain CDR3 sequence of SEQ ID NO:24.

3. The antibody of claim 1, wherein said antibody comprises a heavy chain CDR1 sequence of SEQ ID NO: 9, a heavy chain CDR2 sequence of SEQ ID NO:14 and a heavy chain CDR3 sequence of SEQ ID NO:16; and wherein said antibody comprises a light chain CDR1 sequence of SEQ ID NO:20, a light chain CDR2 sequence of SEQ ID NO:22 and a light chain CDR3 sequence of SEQ ID NO:24.

4. The antibody of claim 1, wherein said antibody comprises a heavy chain CDR1 sequence of SEQ ID NO: 11, a heavy chain CDR2 sequence of SEQ ID NO:15 and a heavy chain CDR3 sequence of SEQ ID NO:17; and wherein said antibody

comprises a light chain CDR1 sequence of SEQ ID NO:21, a light chain CDR2 sequence of SEQ ID NO:23 and a light chain CDR3 sequence of SEQ ID NO:25.

5. A humanized monoclonal antibody or antibody fragment having a heavy chain variable domain and a light chain variable region comprising the amino acid sequences of SEQ ID NO:27 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:28 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:29 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:30 and SEQ ID NO:26, respectively; SEQ ID NO:32 and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:33 and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:34 and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:35 and SEQ ID NO:31, respectively; SEQ ID NO:37 and SEQ ID NO:36, respectively; SEQ ID NO:38 and SEQ ID NO:36, respectively; SEQ ID NO:39 and SEQ ID NO:36, respectively; SEQ ID NO:40 and SEQ ID NO: 36, respectively.

6. An isolated antibody or antigen-binding fragment that specifically binds to human CD40, comprising

a) a humanized heavy chain variable domain comprising a framework region having an amino acid sequence at least 90% identical to the amino acid sequence of the framework region of the human variable domain heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34 or SEQ ID NO:35, and comprising a light chain amino acid sequence at least 90% identical to a corresponding light chain variable of SEQ ID NO:31; or

b) a humanized heavy chain variable domain comprising a framework region having an amino acid sequence at least 90% identical to the amino acid sequence of the framework region of the human variable domain heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO:38; SEQ ID NO:39 or SEQ ID NO: 40, and comprising a light chain amino acid sequence at least 90% identical to a corresponding light chain of SEQ ID NO:36.

7. A humanized monoclonal antibody or antigen binding fragment of an antibody wherein said antibody or antigen binding fragment of the antibody specifically binds to human CD40 having an antagonistic activity IC₅₀ of less than 1nM and has no

agonism up to 100 µg/ml in B cell proliferation and wherein said antibody or antigen binding fragment of the antibody is further characterized in that the antibody or antigen binding fragment of the antibody has an in vivo half life in non-human primates that is at least 10 days; and wherein said antibody or antigen binding fragment of the antibody optionally has a half-life in cynomolgus monkeys of greater than 8 days at a dose of less than 30 mg/kg.

8. A method of blocking the function of human CD40 in a mammal comprising administering to said mammal a composition comprising an antibody of any of claims 1-7 in an amount sufficient to block a CD40 mediated immune response in said mammal.

9. A method of treating or ameliorating a disease or disorder in a mammal comprising administering to said mammal a composition comprising an antibody of any of claims 1-7 in an amount sufficient to decrease one or more of the symptoms of the disease or disorder in the mammal.

10. The method of claim 9, wherein the disease or disorder is selected from the group consisting of: graft v. host disease, autoimmune or inflammatory disease, and CD40-related disorder.

11. The method of claim 10, wherein the autoimmune or inflammatory disease is selected from the group consisting of rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, proliferative lupus glomerulonephritis, inflammatory bowel disease (IBD), psoriasis, idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP), Crohn's Disease and systemic lupus erythematosus (SLE), Hashimoto's thyroiditis, primary myxoedema, thyrotoxicosis/Graves disease, pernicious anaemia, autoimmune atrophic gastritis, autoimmune carditis, Addison's disease, premature menopause, type 1-diabetes mellitus, Good pasture's syndrome, myasthenia gravis, autoimmune haemolytic anaemia, idiopathic leucopenia, primary biliary cirrhosis, active chronic hepatitis (HBs Ag negative), cryptogenic cirrhosis, Sjogren's syndrome, dermatomyositis, scleroderma, mixed tissues connective disease, discoid lupus erythematosus, and systemic vasculitis.

12. The method of any of claims 8-11, further comprising administering a second therapeutic agent selected.

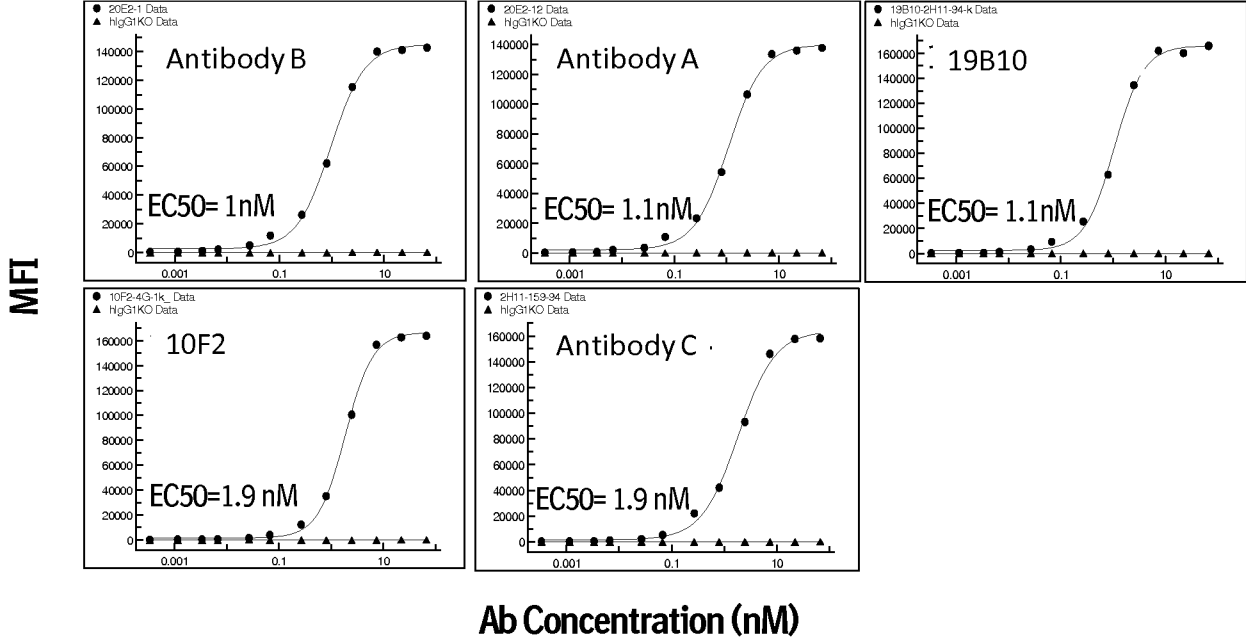
13. The method of any of claims 8-12, wherein said antibody is administered by a parenteral route, intravenous route or subcutaneous route of administration.

14. A pharmaceutical composition comprising: (i) the antibody of any of claims 1-7; and (ii) a pharmaceutically acceptable excipient; and wherein the antibody or antigen binding fragment thereof is optionally conjugated to a second agent.

15. An isolated polynucleotide encoding a heavy chain variable region amino acid sequence or a light chain variable region, wherein the heavy chain variable region amino acid sequence comprises any of SEQ ID NO: 1 to 4, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID. NO. 50, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, or SEQ ID NO: 73; and light chain variable region amino acid sequence comprises any of SEQ ID NO: 5 to SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, or SEQ ID NO:76.

FIGURE 1

A.



B.

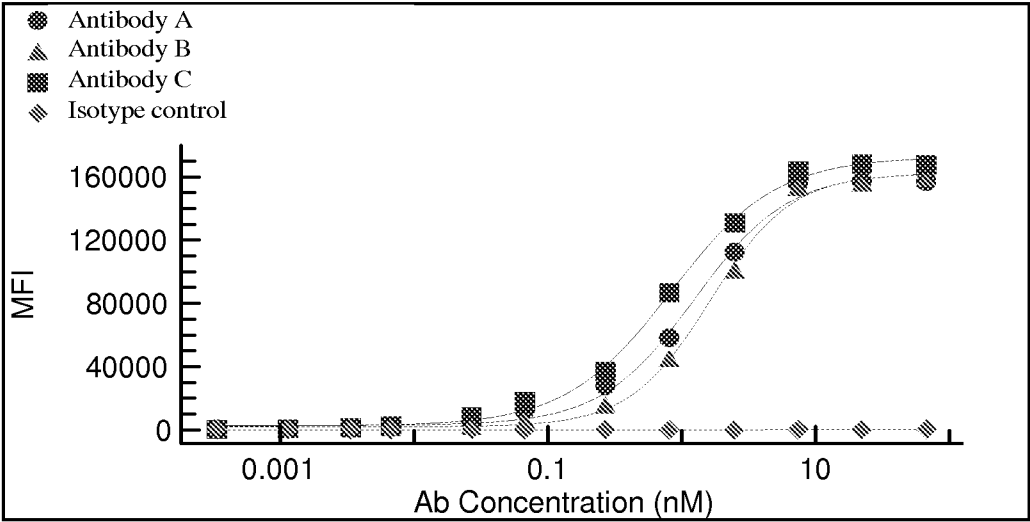


FIGURE 2

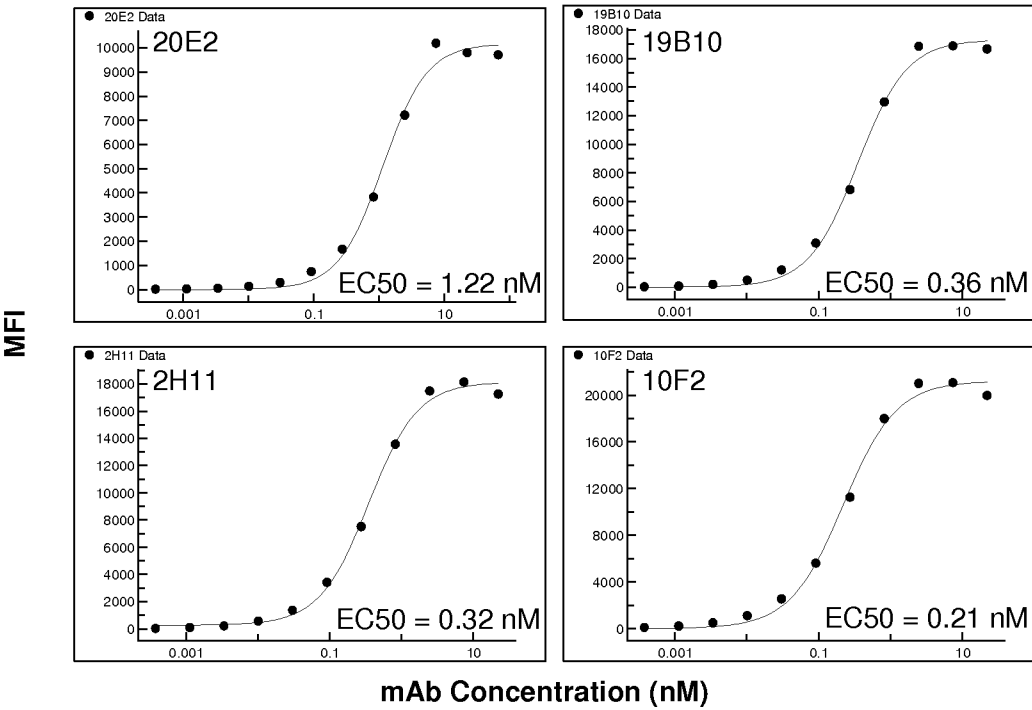
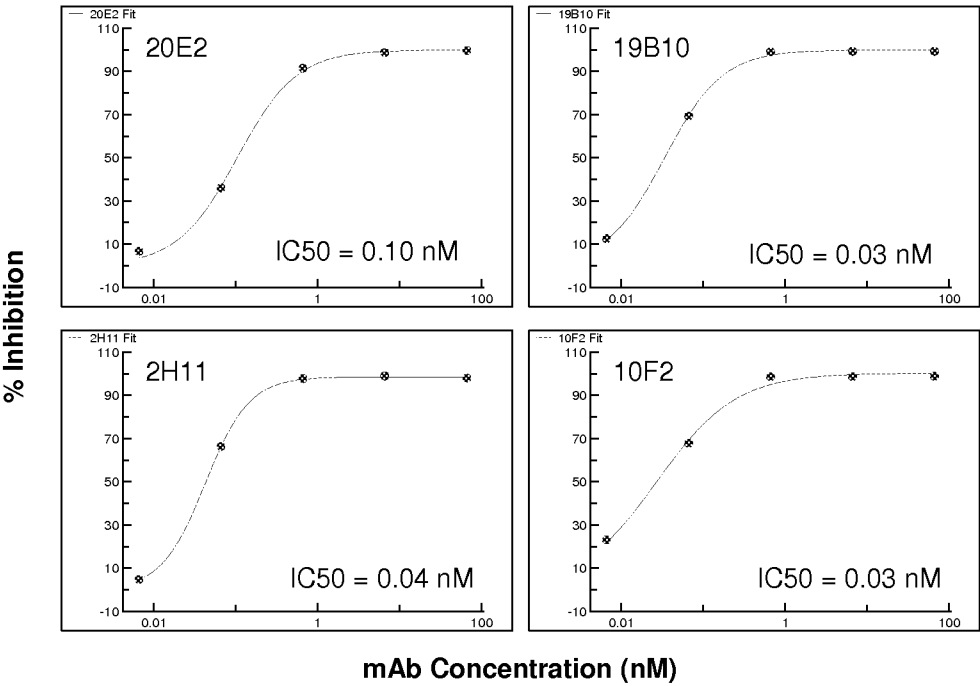


FIGURE 3

A.



B.

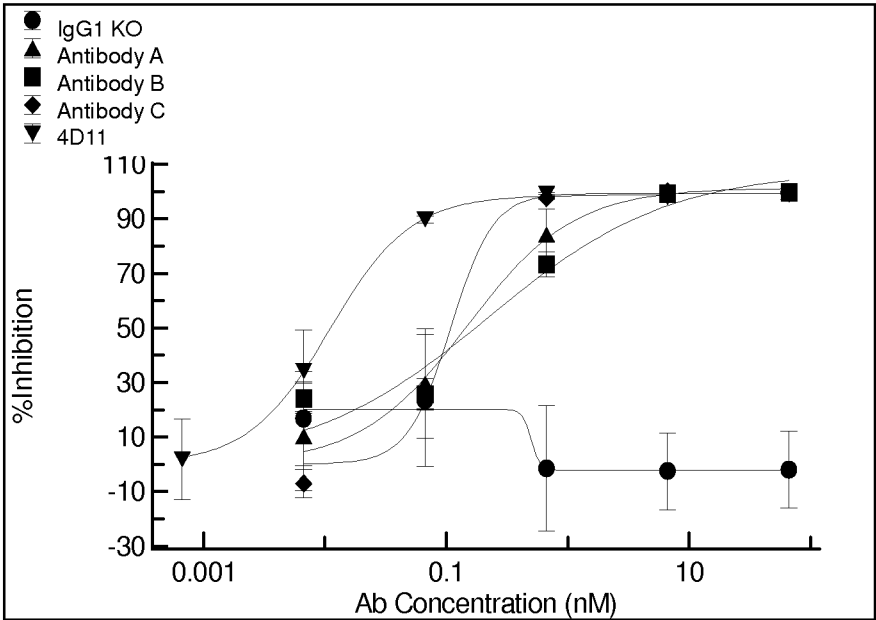


FIGURE 4

Human B cell Proliferation Assay			
		Antagonism	Agonism
Antibody Name	Isotype	Avg. IC ₅₀ nM $\pm$ SEM (n)	SI $\pm$ SEM (n)
Antibody B	hIgG1KO	0.2 $\pm$ 0.09 (n=3)	1 $\pm$ 0.3 (n=3)
Antibody A	hIgG1KO	0.3 $\pm$ 0.03 (n=3)	1 $\pm$ 0.13 (n=3)
Antibody C	hIgG1KO	0.1 $\pm$ 0.01 (n=3)	1 $\pm$ 0.06 (n=3)
10F2	hIgG1KO	0.8 $\pm$ 0.11 (n=3)	1 $\pm$ 0.09 (n=3)
4D11	hIgG4DM	0.02 $\pm$ 0.01 (n=3)	1 $\pm$ 0.11 (n=3)
G28.5	mIgG1	NT	7 $\pm$ 1.94 (n=3)
mu5D12	hIgG4Pro	No Inhibition up to 67nM	18 $\pm$ 3.1 (n=3)

NT=Not tested

FIGURE 5

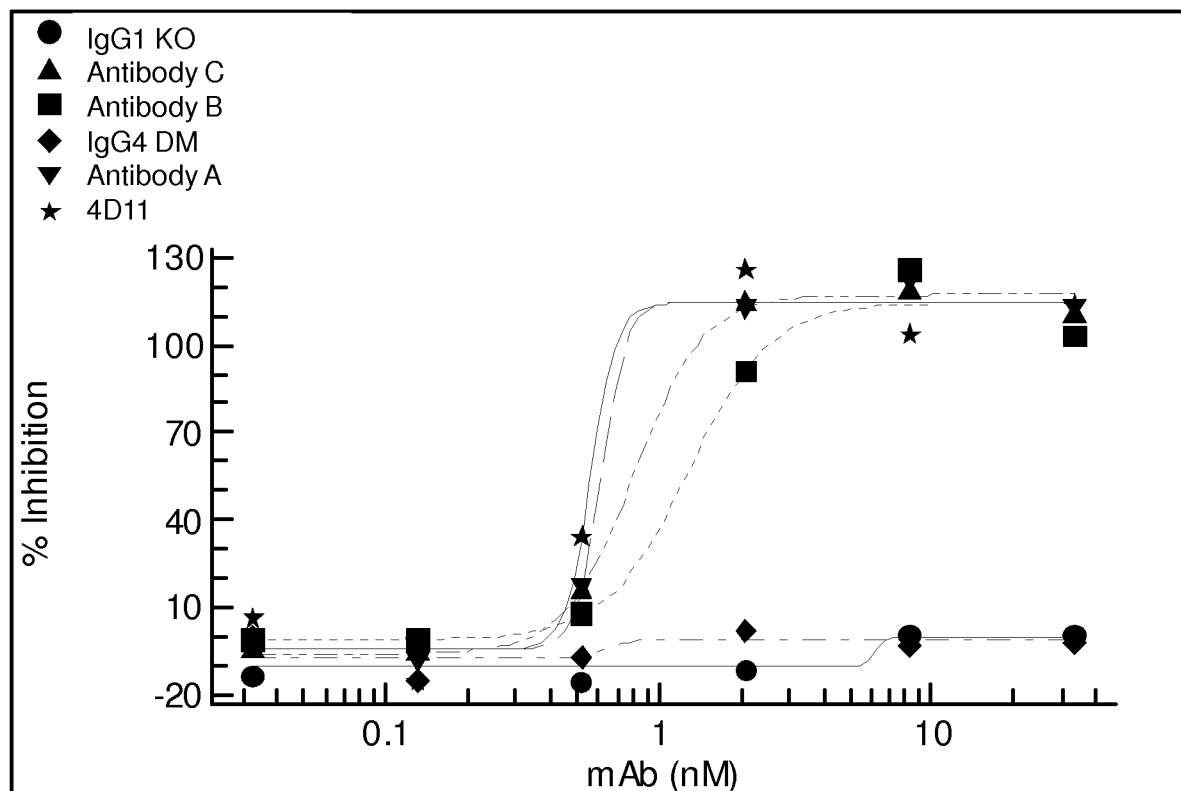


FIGURE 6

A.	mAb (isotype)	IC50 (nM +/- SEM)		Fold Change
		Purified B cells	HWB	
	Antibody B	0.6 +/- 0.3 (n=4)	1.3 +/- 0.7 (n=4)	2.2
	4D11 (hIgG4 DM)	0.03 +/- 0.01 (n=5)	0.6 +/- 0.3 (n=4)	20.0

B.	mAb (isotype)	IC90 (nM +/- SEM)		Fold Change
		Purified B cells	HWB	
	Antibody B	5.3 +/- 2.4 (n=4)	4.3 +/- 2.1 (n=4)	0.8
	4D11 (hIgG4 DM)	0.05 +/- 0.02 (n=5)	1.3 +/- 0.64 (n=4)	26

FIGURE 7

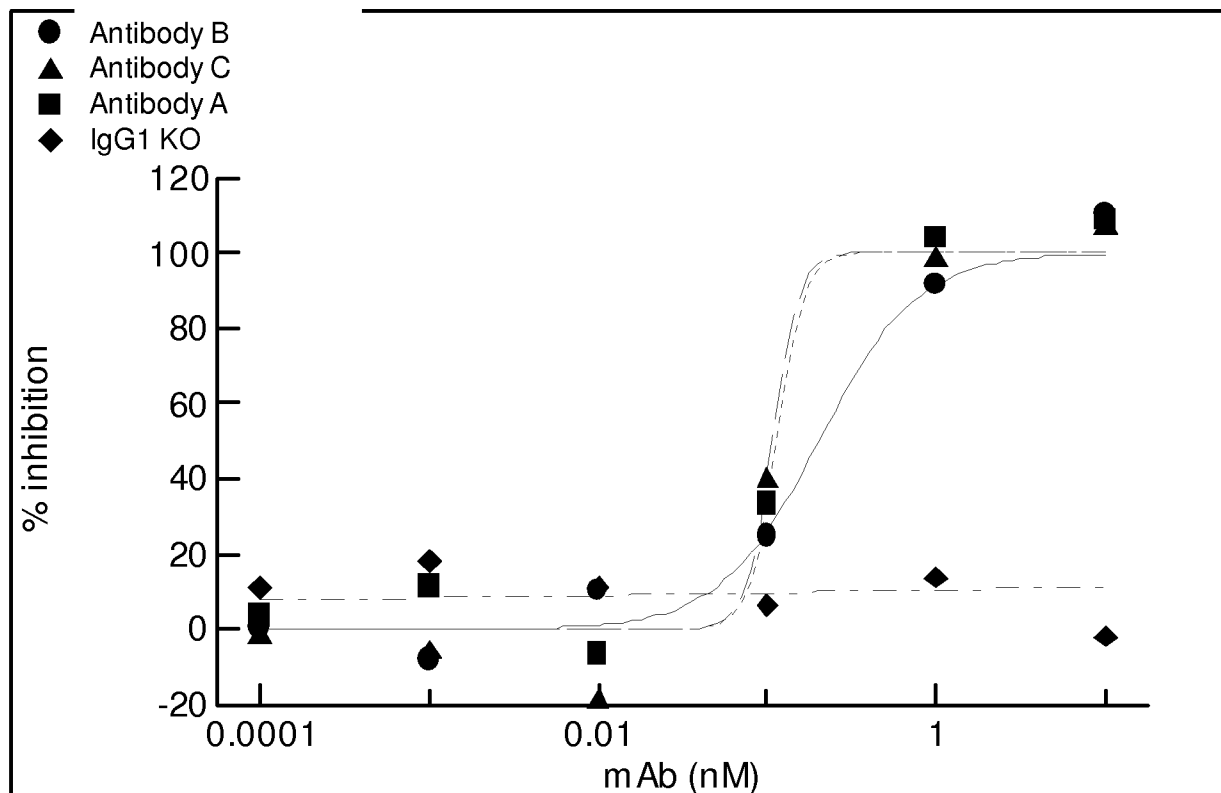


FIGURE 8

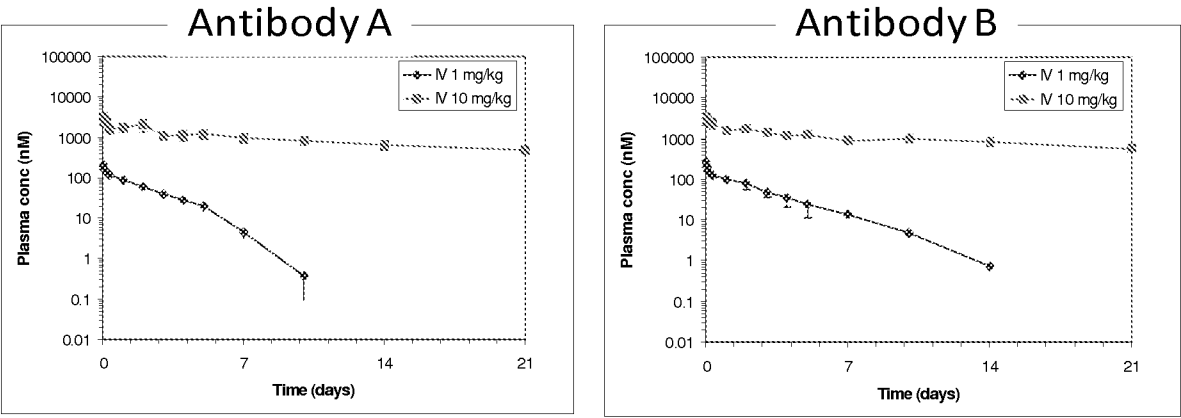


FIGURE 9

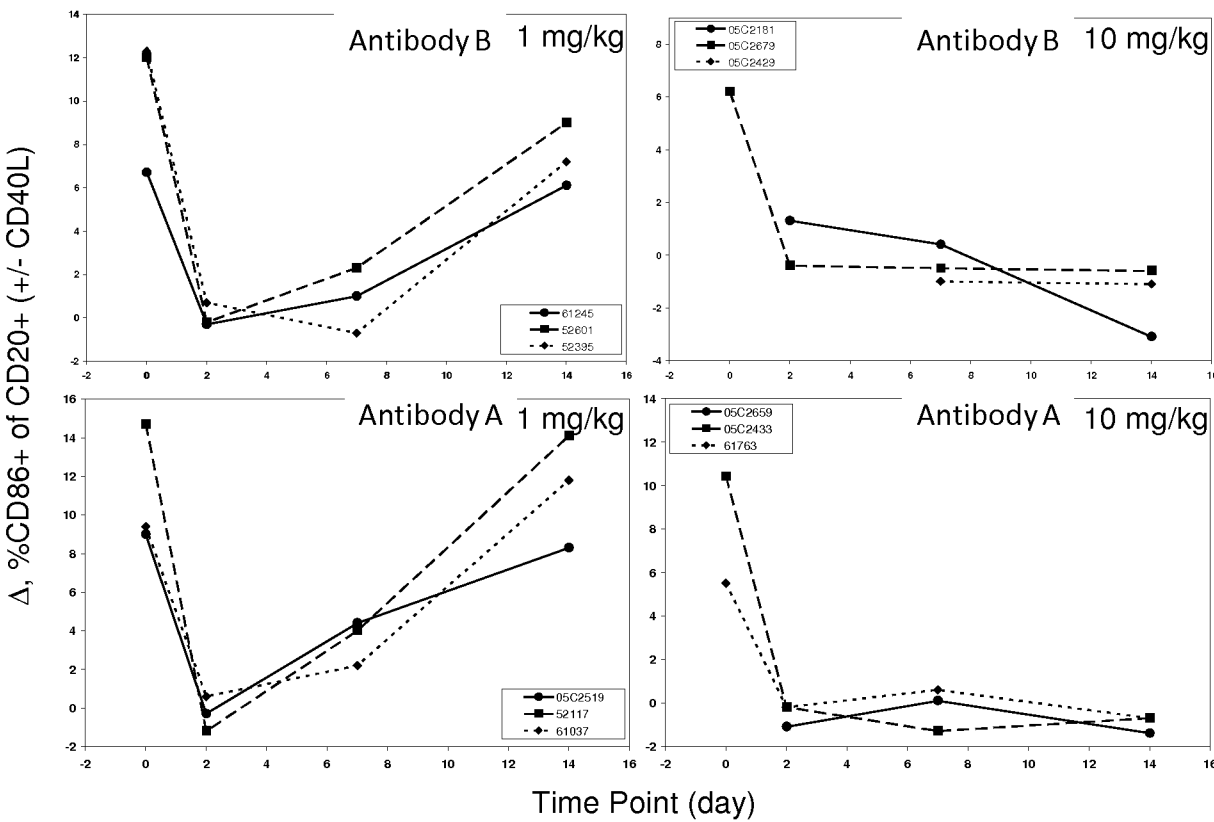
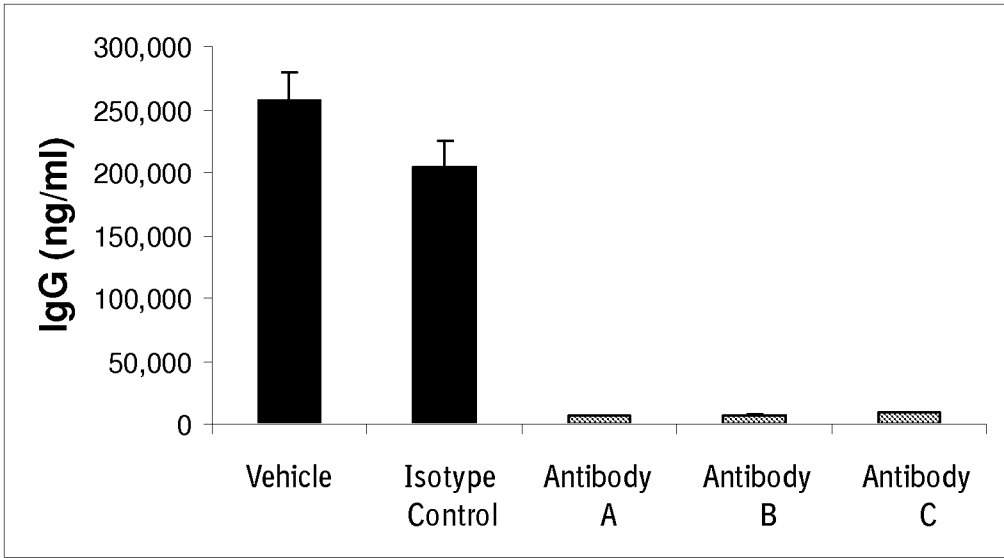


FIGURE 10

A.



B.

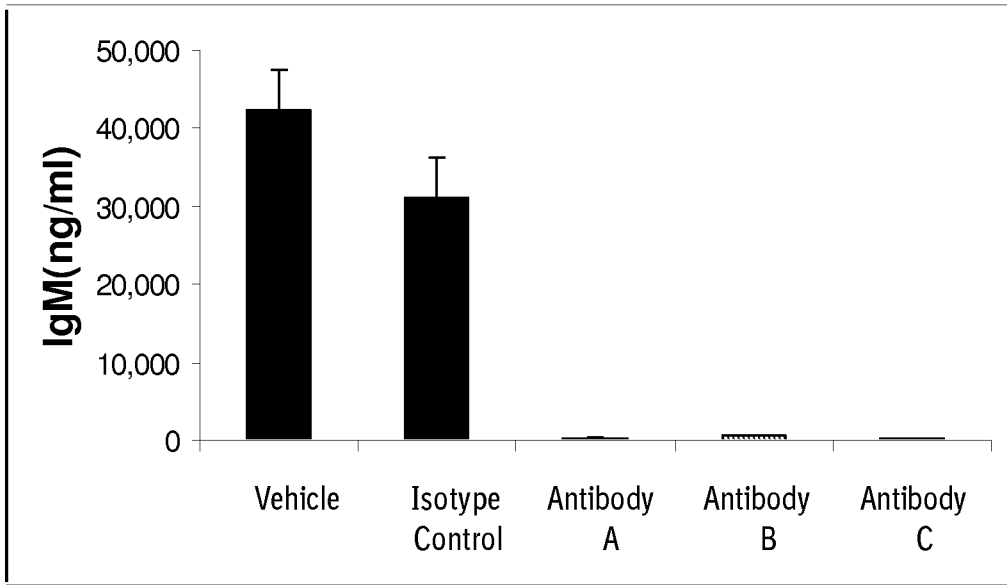


FIGURE 11

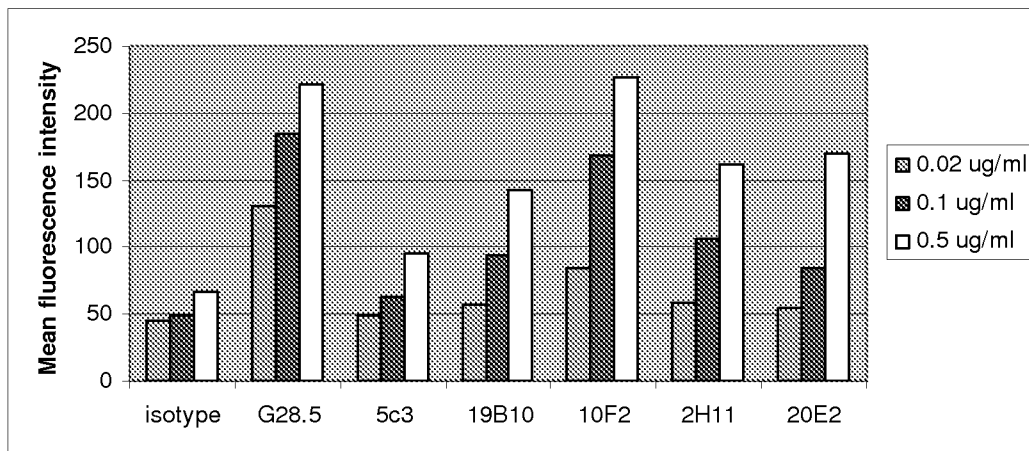
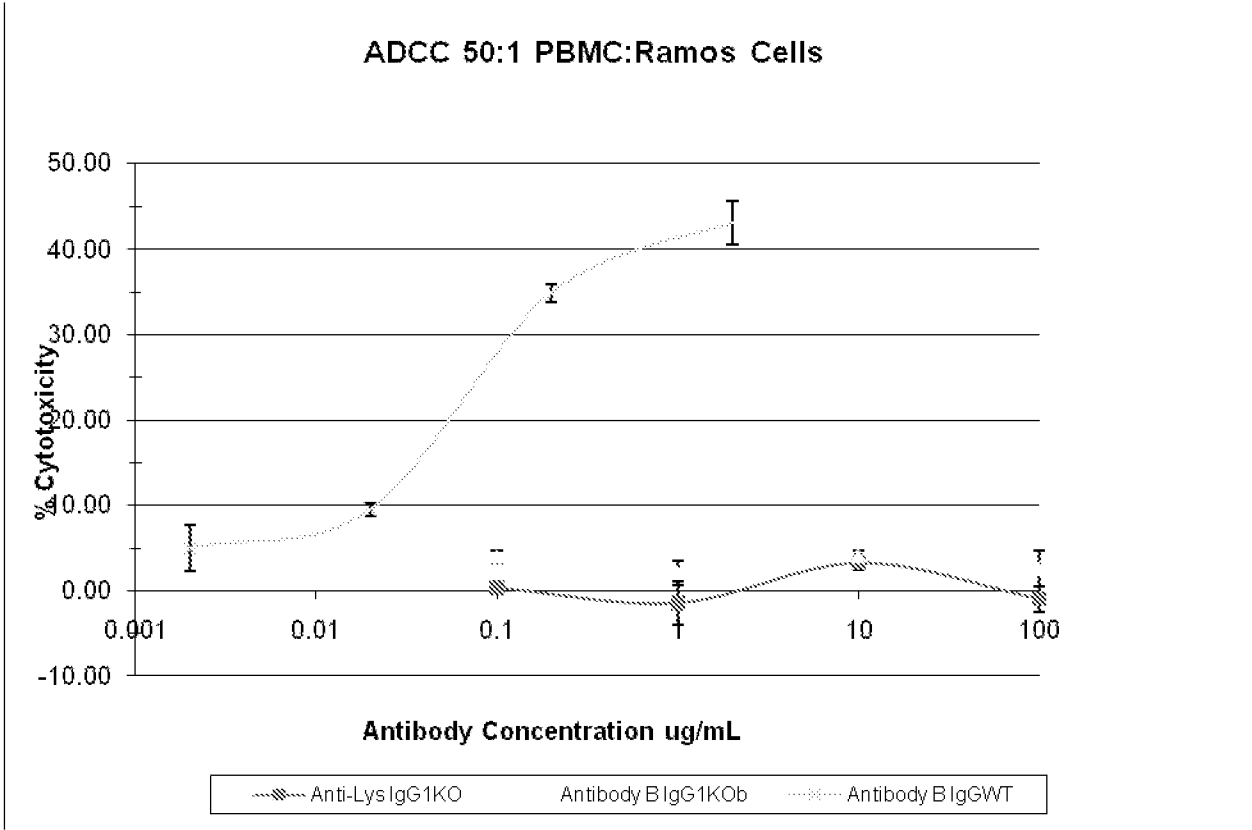


FIGURE 12

	EC50 nM (range)	
	Antibody B	4D11
B cells		
Human (n = 6)	1.8 (1.2 to 2.3)	0.3 (0.1 to 0.3)
Cynomolgus (n = 5)	2.1 (1.4 to 2.9)	0.7 (0.6 to 0.8)
Platelets		
Human (n = 5)	4.6 (2.5 to 5.8)	0.7 (0.4 to 0.9)
Cynomolgus (n = 5)	3.9 (2.7 to 6.2)	1.2 (0.9 to 1.7)

FIGURE 13



ANTICUERPOS ANTI-CD40

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] Esta invención se refiere en general a anticuerpos anti-CD40 humanizados para uso diagnóstico y terapéutico. Más específicamente, se divulgan anticuerpos anti-CD40 humanizados y métodos de uso para el tratamiento de varias enfermedades o trastornos caracterizados por células que expresan CD40. También se divulgan composiciones farmacéuticas y kits que comprenden el anticuerpo anti-CD40 humanizado.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] CD40 es una glicoproteína de membrana integral tipo I de 48kDa y un miembro de la superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral (TNF). CD40 se expresa en una variedad de tipos celulares incluyendo linfocitos B normales y neoplásicos, células interdigitantes, carcinomas, células epiteliales (por ejemplo, queratinocitos), fibroblastos (por ejemplo, sinoviocitos) y plaquetas. También está presente en monocitos, macrófagos, algunas células endoteliales y células dendríticas foliculares. CD40 se expresa temprano en ontogenia de linfocitos B, apareciendo en precursores de linfocitos B posterior a la aparición de CD10 y CD19, pero antes de la expresión de CD21, CD23, CD24, y la aparición de la inmunoglobulina M de superficie (sIgM) (Uckun, 1990 , Blood 15:2449). CD40 también se ha detectado en células de amígdalas y células plasmáticas derivadas de médula ósea (Pellat-Decounynck, 1994, Blood 84:2597).

[0003] El ligando de CD40 es CD40L (también conocido como CD154, gp39, y TRAP), un miembro de la superfamilia de TNF. CD40L es una proteína de transmembrana expresada predominantemente en las células T CD4⁺ activadas y un pequeño subconjunto de células T CD8⁺ (Revisado por (Van Kooten C. y Banchereau, 2000).

[0004] La interacción de CD40 con CD40L induce respuestas inmunes tanto humorales como mediadas por células. CD40 regula este par ligando-receptor para activar linfocitos B y otras células presentadoras de antígenos-(APC) incluyendo células dendríticas (DC) (Revisado por (Toubi y Shoenfeld, 2004);(Kiener, 1995). La función de CD40 en los linfocitos B se ha estudiado ampliamente. La activación de CD40 en los linfocitos B induce proliferación,

diferenciación en células secretoras de anticuerpos e intercambio de isotipos en centros germinales de órganos linfoides secundarios. Estudios *in vitro* han mostrado efectos directos de la activación de CD40 sobre la producción de citoquinas (IL-6, IL-10, TNF- δ , LT- α), expresión de moléculas de adhesión y receptores coestimuladores (ICAM, CD23, CD80 y CD86), y expresión aumentada de MHC clase I, MHC clase II, y transportador TAP por linfocitos B (Liu, 1996). Para la mayoría de estos procesos, CD40 actúa en concierto con bien sea citoquinas u otras interacciones receptor-ligando.

[0005] La señalización de CD40 sobre monocitos y DCs resulta en supervivencia aumentada así como secreción de citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α y MIP-1 α). La ligadura de CD40 sobre estos APCs también conduce a regulación positiva de moléculas coestimulantes tales como (ICAM-1, LFA-3, CD80, y CD86). La activación de receptores de CD40 es una de las señales críticas que permiten la maduración completa de DC en APCs eficientes promoviendo la activación de células T (Banchereau y Steinman, 1998) (Van Kooten C. y Banchereau, 2000).

[0006] Estudios recientes en modelos de ratón mostraron que la señalización de CD40 sobre células dendríticas también juega un papel importante en la generación de células TH17 las cuales son consideradas como mediadoras de autoinmunidad en enfermedades tales como la artritis y la esclerosis múltiple (Iezzi, 2009) (Perona-Wright, 2009).

[0007] La disponibilidad de ratones *knock out* CD40 y CD40L así como anticuerpos anti-ratón agonistas y antagonistas ofreció la posibilidad de estudiar el papel de las interacciones CD40-CD40L en varios modelos patológicos. La administración de anti-CD40L bloqueador ha demostrado ser beneficiosa en varios modelos de autoinmunidad, incluyendo enfermedades espontáneas como la nefritis por lupus en ratones SNF1 o diabetes en ratones NOD o en formas experimentalmente inducidas de la enfermedad como artritis inducida por colágeno (CIA) o encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) (Toubi y Shoenfeld, 2004). CIA en ratones fue inhibida por un mAb anti-CD40L el cual bloqueó el desarrollo de inflamación de articulaciones, títulos de anticuerpos séricos con respecto al colágeno, la infiltración de células inflamatorias en el tejido subsinovial además de la erosión de cartílago y de hueso (Durie, 1993). Tanto para nefritis lúpica como EAE, se demostró que anti-CD40L también podría aliviar la enfermedad en

curso, lo que confirma el papel de CD40-CD40L en la fase efectora de la enfermedad (Kalled, 1998);(Howard, 1999).

[0008] También se estudió el papel de las interacciones de CD40-CD40L en el desarrollo de EAE en ratones con deficiencia de CD40L que llevaban un receptor celular T transgénico específico para la proteína básica de la mielina. Estos ratones no desarrollaron EAE después del cebado con antígeno, y las células T CD4⁺ se mantuvieron en reposo y no produjeron INF- γ (Grewal, 1996).

[0009] Además, los anticuerpos inhibidores dirigidos contra CD40 mostraron efectos beneficiosos en modelos de enfermedades inflamatorias tales como EAE. Lamann y colegas demostraron que el anticuerpo monoclonal CD40 anti-humano de ratón antagonista mu5D12 y una versión quimérica de este mAb evitaron eficazmente la expresión clínica de EAE desmielinizante crónica en monos marmoset no consanguíneos (Laman, 2002);(Boon, 2001). Un estudio de seguimiento demostró que el tratamiento terapéutico con el anticuerpo CD40 anti-humano quimérico reduce la inflamación detectable por MRI y retrasa el crecimiento de las lesiones cerebrales pre-existentes en el modelo EAE marmoset (Hart, 2005).

[0010] Anticuerpos anti-CD40 con actividad agonista se ensayaron en modelos de ratón de artritis con algunos resultados contradictorios. Como era de esperarse para un agente inmunoestimulador, se mostró que el anticuerpo monoclonal CD40 agonista anti-ratón FGK45 exacerbó la enfermedad en el modelo DBA /1 ratón de CIA (Tellander, 2000). Sin embargo, en otro modelo CIA crónico FGK45, y otro anticuerpo CD40 agonista anti-ratón ,3/23, ambos mostraron efectos terapéuticos positivos (Mauri, 2000). Se postuló por este grupo que los anticuerpos agonistas en este régimen de tratamiento terapéutico tienen un efecto beneficioso al inducir desviación inmune hacia una respuesta Th2 con niveles disminuidos de IFN- γ y niveles aumentados de IL-4 e IL 10-(Mauri, 2000).

[0011] También se ha documentado la prevención del rechazo de trasplantes al bloquear las interacciones CD40/CD154. El uso de ch5D12, un antagonista anti-CD40 quimérico, en estudios de aloinjertos renales en monos rhesus indica que el antagonismo de CD40 es suficiente para la modificación patológica y extensión de tiempos medios de supervivencia más allá de 100 días. Cuando ch5D12 fue combinado con un anticuerpo anti-CD86 y dado sólo en el inicio de los estudios de aloinjertos seguido por tratamiento prolongado con ciclosporina, se lograron tiempos

de supervivencia mayores de 4 años, lo que indica que esta combinación puede inducir potencialmente tolerancia (Haanstra, 2005).

[0012] Por lo tanto, existen amplios estudios preclínicos que proporcionan evidencia del papel crucial de la díada de CD40-CD40L en el desarrollo de una eficiente respuesta inmune dependiente de células T. Por lo tanto, el bloqueo de la señalización de CD40 se reconoce como una estrategia terapéutica adecuada y necesaria para suprimir una respuesta autoinmune patógena en enfermedades tales como artritis reumatoide, esclerosis múltiple o psoriasis. Sin embargo, hasta la fecha, no existen anticuerpos CD40 que hayan sido aprobados para intervención terapéutica de tales trastornos debido a los hallazgos con respecto a los efectos secundarios significativos de los anticuerpos anti-CD40 previamente en desarrollo. Por lo tanto, existe una necesidad significativa de agentes terapéuticos que puedan utilizarse para intervenir en la acción de los CD40-CD40L y bloquear la señalización CD40. Esta necesidad se podría atenderse mediante nuevos anticuerpos anti-CD40 humanizados que específicamente fijan CD40 y que muestren la especificidad de unión con antígenos, la afinidad y las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas que permiten el uso del mismo en la intervención terapéutica de trastornos basados en CD40.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

[0013] La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal humanizado en donde dicho anticuerpo específicamente se fija a CD40 humano que tiene un IC₅₀ de actividad antagonista menor a 1 nM y no tiene agonismo en hasta 100 µg/ml en la proliferación de linfocitos B y en donde dicho anticuerpo se caracteriza además en que el anticuerpo tiene una vida media in vivo en primates no humanos que tenga por lo menos 10 días.

[0014] El anticuerpo monoclonal humanizado se puede caracterizar además en que el anticuerpo tiene una vida media en monos cynomolgus de más de 8 días a una dosis de menos de 30 mg/kg.

[0015] En realizaciones de ejemplo, el anticuerpo de la invención comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consta de la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 4 y una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consta de la SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 8.

[0016] En otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión de antígenos de un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de las SEQ ID N°: 1 a la 4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO : 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO. 50 SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO : 72, o SEQ ID NO: 73.

[0017] En otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión de antígenos de un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, o SEQ ID NO: 76.

[0018] En realizaciones específicas, el anticuerpo monoclonal descrito en la presente se caracteriza por que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la secuencia CDR1 de cadena pesada seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 9 a SEQ ID NO: 11, una secuencia CDR2 de cadena pesada seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 12 a SEQ ID NO: 15 y una secuencia CDR3 de cadena pesada seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO: 17; y en donde la secuencia CDR1 de cadena ligera tiene una secuencia seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 18 a SEQ ID NO: 21, una secuencia CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO: 22 a SEQ ID NO: 23 y una secuencia CDR3 de cadena ligera seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 24 a SEQ ID NO: 25.

[0019] En realizaciones específicas, el anticuerpo monoclonal descrito en la presente se caracteriza por que comprende una secuencia CDR1 de cadena pesada de SEQ ID NO: 10, una secuencia CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO: 13 y una secuencia CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 16 y en donde dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR1 de cadena ligera de SEQ ID NO: 19, una secuencia CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO: 22 y una secuencia CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 24.

[0020] En otras realizaciones específicas, el anticuerpo monoclonal descrito en la presente se caracteriza porque comprende una secuencia CDR1 de cadena pesada de SEQ ID NO: 9, una secuencia CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO: 14 y una secuencia CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 16 y en donde dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR1 de cadena ligera de SEQ ID NO: 20, una secuencia CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO: 22 y una secuencia CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 24.

[0021] También se describe en la presente secuencias individuales para cadenas pesadas de los anticuerpos preferidos de la invención. La invención, por ejemplo, se refiere a un anticuerpo anti-CD40 que comprende una secuencia de cadena pesada de dominio variable de cualquiera de SEQ ID NOs: 1 a 4. El anticuerpo anti-CD40 se caracteriza además por que comprende una secuencia de dominio variable de cadena ligera de cualquiera de SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 8.

[0022] También se contempla un anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 26, respectivamente; SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 26, respectivamente; SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 26, respectivamente; SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 26, respectivamente; SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 31, respectivamente; SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 31, respectivamente; SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 31, respectivamente; SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 31, respectivamente; SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 36, respectivamente; SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 36, respectivamente; SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 36, respectivamente; SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 36, respectivamente.

[0023] Otra realización se refiere a un anticuerpo aislado o fragmento de unión de antígenos que se fija específicamente a CD40 humano, que comprende un dominio variable de cadena pesada humanizado que comprende una región variable que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la región variable de la secuencia de aminoácidos humana de cadena pesada de dominio variable de SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 30, y que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera al menos 90% idéntica a un dominio variable de cadena ligera correspondiente de SEQ ID NO: 26.

[0024] Otra realización se refiere a un anticuerpo aislado o fragmento de unión de antígenos que se fija específicamente a CD40 humano, que comprende un dominio variable humanizado de cadena pesada que comprende una región variable que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la región variable de la secuencia de aminoácidos humana de cadena pesada de dominio variable de SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO: 35, y que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera al menos 90% idéntica a una variable de cadena ligera correspondiente de SEQ ID NO: 31.

[0025] También se contempla un anticuerpo aislado o fragmento de unión de antígenos que se fija específicamente a CD40 humano, que comprende un dominio variable humanizado de cadena pesada que comprende una región variable que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la región variable de la secuencia de aminoácidos humana de cadena pesada de dominio variable de SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 40, y que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera al menos 90% idéntica a una cadena ligera correspondiente de SEQ ID NO: 36.

[0026] Los anticuerpos de la presente invención pueden caracterizarse además por que dichos anticuerpos no pudieron estimular la producción de citoquinas a partir de linfocitos B en ausencia de CD40L.

[0027] Los anticuerpos de la presente invención se pueden caracterizar además por que dichos anticuerpos se fijan a CD40 humano en presencia de suero humano al 50% con una reducción en la tasa de menos de dos veces.

[0028] Los anticuerpos de la presente invención se puede caracterizar además por que dicho anticuerpo produce inhibición de la producción de IgM e IgG en un mamífero a una concentración de 1 mg/kg.

[0029] Los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse en varios métodos terapéuticos, profilácticos, diagnósticos y otros. Por ejemplo, la presente invención describe un método para bloquear la función de CD40 humano en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una composición que comprende un anticuerpo de la invención en una cantidad suficiente para bloquear una respuesta inmune mediada por CD40 en dicho mamífero.

[0030] También se contempla en la presente un método para tratar o mejorar la enfermedad de injerto contra huésped en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una composición que comprende un anticuerpo de la invención en una cantidad suficiente para disminuir uno o más de los síntomas de la enfermedad injerto contra huésped en dicho animal.

[0031] A modo de ejemplo, la enfermedad autoinmune o inflamatoria puede incluir, pero no se limita a artritis reumatoide, esclerosis múltiple, glomerulonefritis lúpica proliferativa, enfermedad intestinal inflamatoria (IBD), psoriasis, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), enfermedad de Crohn y lupus eritematoso sistémico (SLE), tiroiditis de Hashimoto, myxedema primario, tirotoxicosis/enfermedad de Graves, anemia perniciosa, gastritis atrófica autoinmunitaria, carditis autoinmune, enfermedad de Addison, menopausia prematura, diabetes mellitus tipo 1, síndrome de Goodpasture, miastenia grave, anemia hemolítica autoinmune, leucopenia idiopática, cirrosis biliar primaria, hepatitis crónica activa (HBs Ag negativo), cirrosis criptogénica, síndrome de Sjögren, dermatomiositis, esclerodermia, enfermedad mixta del tejido conectivo, lupus eritematoso discoide y vasculitis sistémica. En realizaciones de ejemplo, el mamífero tiene artritis reumatoide.

[0032] Los métodos de la invención pueden comprender además, administrar un segundo agente terapéutico seleccionado del grupo que consta de un antagonista TNF, un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad, un antagonista CTLA4, un anticuerpo monoclonal (mAb) dirigido al receptor anti-IL-6 y un anticuerpo monoclonal anti-CD20.

[0033] En realizaciones específicas, la enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmune es una enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmune que está asociada con células que expresan ambos CD40 y CD20.

[0034] En métodos específicos el tratamiento implica la administración de la composición de anticuerpo por vía de administración parenteral.

[0035] En métodos específicos el tratamiento implica la administración de la composición de anticuerpo por vía intravenosa o subcutánea.

[0036] Métodos adicionales de la invención comprenden la inhibición de la producción de anticuerpos mediante linfocitos B en un paciente humano que comprende administrar a dicho paciente humano una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-CD40 de la invención.

[0037] Más específicamente, el paciente humano tiene una enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmune que está asociada con las células que expresan CD40.

[0038] En realizaciones de ejemplo el paciente humano sufre de una enfermedad autoinmune seleccionada del grupo que consta de una enfermedad autoinmune o inflamatoria seleccionada del grupo que consta de artritis reumatoide, esclerosis múltiple, glomerulonefritis lúpica proliferativa, enfermedad intestinal inflamatoria (IBD), psoriasis, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), enfermedad de Crohn y lupus eritematoso sistémico (LES), tiroiditis de Hashimoto, myxedema primario, tirotoxicosis/enfermedad de Graves, anemia perniciosa, gastritis atrófica autoinmunitaria, carditis autoinmune, enfermedad de Addison, menopausia prematura, diabetes mellitus tipo 1, síndrome de Goodpasture, miastenia grave, anemia hemolítica autoinmune, leucopenia idiopática, cirrosis biliar primaria, hepatitis crónica activa (HBs Ag negativo), cirrosis criptogénica, síndrome de Sjogren, dermatomiositis, esclerodermia, enfermedad mixta del tejido conectivo, lupus eritematoso discoide, y vasculitis sistémica.

[0039] Otro método de la invención se refiere a la inhibición del crecimiento de células que expresan antígeno CD40 humano, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión de antígenos de la invención a las células, dicho anticuerpo o fragmento de unión de antígenos se fija específicamente al antígeno CD40 de superficie celular humana, en donde la unión del anticuerpo o fragmento de unión de antígenos del antígeno CD40 inhibe el crecimiento o diferenciación de las células.

[0040] También se contempla un método para tratar un sujeto que tiene un trastorno asociado con CD40, que comprende administrar al sujeto el anticuerpo o fragmento de unión de antígenos de la invención, dicho anticuerpo o fragmento de unión de antígenos se fija específicamente a CD40 humano, en donde la unión del anticuerpo o fragmento de unión de antígenos de CD40 inhibe el crecimiento o diferenciación de células del trastorno asociado con CD40. Las células pueden ser, pero no se limitan a células linfoblastoides B, pancreáticas,

células pulmonares, células de mama, células de ovario, células de colon, células de próstata, células dérmicas, células de cabeza y cuello, células de vejiga, células óseas o células renales.

[0041] El método de tratamiento para inhibir el crecimiento o diferenciación de células puede ser útil en el tratamiento de leucemia linfocítica crónica, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, linfoma de células T, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, macroglobulinemia de Waldenstrom o sarcoma de Kaposi.

[0042] También se contempla un método para inducir la reducción de linfocitos B periféricos, que comprende administrar a las células el anticuerpo o fragmento de unión de antígenos de la invención, dicho anticuerpo o fragmento de unión de antígenos se fija específicamente a un antígeno CD40 de superficie celular humana, en donde la unión del anticuerpo o fragmento de unión de antígenos al antígeno CD40 induce la reducción de las células.

[0043] En realizaciones específicas, el anticuerpo o fragmento de unión de antígenos se administra a un sujeto que tiene un trastorno inmune. Por ejemplo, el trastorno inmune es artritis reumatoide o lupus eritematoso sistémico.

[0044] También se contempla un método de tratamiento de artritis reumatoide en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto un anticuerpo de la invención, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo antagonista que bloquea la función de CD40 en dicho sujeto.

[0045] Preferiblemente, el anticuerpo se administra en una cantidad efectiva para inhibir la diferenciación de linfocitos B y cambios de isotipos de anticuerpos en dicho sujeto.

[0046] En otras realizaciones, el anticuerpo se administra en una cantidad efectiva para inhibir la producción de citoquinas y quimioquinas y la regulación positiva de moléculas de adhesión en células T y macrófagos en dicho sujeto. Preferiblemente, el anticuerpo se administra en una cantidad efectiva para inhibir la activación de células dendríticas en dicho sujeto.

[0047] En otras realizaciones, el método se caracteriza además en que el anticuerpo se administra en una cantidad efectiva para inhibir la producción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, metaloproteinasas de matriz, prostaglandinas, y para regular de manera negativa las moléculas de adhesión de células no inmunes en dicho sujeto.

[0048] En realizaciones específicas, el anticuerpo se administra en combinación con un régimen que comprende la administración de metotrexato y/o la administración de Enbrel/Humira.

[0049] El sujeto que recibe la terapia es un sujeto que padece de artritis reumatoide y que no ha respondido al tratamiento con metotrexato solo.

[0050] En realizaciones específicas, el método comprende tratar a dicho sujeto con un régimen que comprende la administración de metotrexato y/o la administración de Enbrel/Humira.

[0051] El método de la invención puede caracterizarse además en que el tratamiento de dicho sujeto con dicho anticuerpo anti-CD40 antagonista tiene una eficacia superior al tratamiento con metotrexato solamente, Enbrel solamente, una combinación de Enbrel + metotrexato.

[0052] El método de la invención puede caracterizarse además en que el tratamiento de dicho sujeto con dicho anticuerpo anti-CD40 antagonista tiene una eficacia superior al tratamiento con Enbrel + MTX en pacientes que han tenido una respuesta inadecuada al metotrexato.

[0053] En realizaciones específicas, el anticuerpo se administra en combinación con un régimen que comprende un agente anti-TNF.

[0054] En realizaciones específicas, el sujeto se caracteriza por padecer de artritis reumatoide y no haber respondido al tratamiento con solo un agente anti-TNF. En tales realizaciones, el método puede comprender el tratamiento de dicho sujeto con un régimen que comprende tratar con un agente anti-TNF en combinación con dicho anticuerpo anti-CD40 antagonista.

[0055] En realizaciones específicas, el tratamiento de dicho sujeto con dicho anticuerpo anti-CD40 antagonista tiene una eficacia superior al tratamiento con un agente anti-TNF.

[0056] En aún otras realizaciones, el método se caracteriza en que el tratamiento de dicho sujeto con dicho anticuerpo anti-CD40 antagonista tiene una eficacia superior al tratamiento con Orencia o Rituxan en pacientes que han tenido una respuesta inadecuada a solo un agente anti-TNF.

[0057] La presente invención contempla además una composición farmacéutica que comprende: (i) el anticuerpo o fragmento de unión de antígenos como se describe en la presente, y (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable. En tales composiciones, el anticuerpo o fragmento de unión de antígenos de los mismos puede ventajosamente conjugarse con un segundo agente, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, un vehículo PEG, una enzima o un marcador.

[0058] También se contemplan en la presente un polinucleótido aislado que codifica una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de cualquiera de SEQ ID N °: 1 a 4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 , SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID. NO. 50, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, o SEQ ID NO: 73.

[0059] También se contempla en la presente un polinucleótido aislado que codifica una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de cualquiera de SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO : 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, o SEQ ID NO: 76.

[0060] La invención se refiere además a la utilización de los anticuerpos descritos en la presente para la fabricación de un medicamento para el bloqueo de la función de CD40 humano en un mamífero en donde el medicamento bloquea una respuesta inmune mediada por CD40 en dicho mamífero.

[0061] En una realización la invención se refiere a la fabricación de un medicamento para tratar o mejorar la enfermedad de injerto contra huésped en un mamífero.

[0062] En realizaciones de ejemplo, el medicamento se fabrica para el tratamiento de una enfermedad autoinmune o inflamatoria seleccionada del grupo que consta de artritis reumatoide, esclerosis múltiple, glomerulonefritis lúpica proliferativa, enfermedad intestinal inflamatoria

(IBD), psoriasis, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), enfermedad de Crohn y l lupus eritematoso sistémico (LES), tiroiditis de Hashimoto, myxedema primario, tirotoxicosis/enfermedad de Graves, anemia perniciosa, gastritis atrófica autoinmunitaria, carditis autoinmune, enfermedad de Addison, menopausia prematura, diabetes mellitus tipo 1, síndrome de Goodpasture, miastenia gravis, anemia hemolítica autoinmune, leucopenia idiopática, cirrosis biliar primaria, hepatitis crónica activa (HBs Ag negativo), cirrosis criptogénica, síndrome de Sjögren, dermatomiositis, esclerodermia, enfermedad mixta del tejido conectivo, lupus eritematoso discoide y vasculitis sistémica.

[0063] En algunas realizaciones, el medicamento puede comprender además un segundo agente terapéutico seleccionado del grupo que consta de un antagonista TNF, un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad, un antagonista CTLA4, un anticuerpo monoclonal (mAb) dirigido al receptor anti-IL-6 y un anticuerpo monoclonal anti-CD20.

[0064] El medicamento puede fabricarse para uso en una vía de administración parenteral. El medicamento puede ser fabricado para uso por vía intravenosa o subcutánea.

[0065] Otra realización contempla un uso de los anticuerpos descritos en la presente para la fabricación de un medicamento para la inhibición de la producción de anticuerpos mediante linfocitos B en un paciente humano.

[0066] Otra realización contempla un uso de los anticuerpos descritos en la presente para la fabricación de un medicamento para inhibir el crecimiento y/o diferenciación de células que expresan el antígeno CD40 humano.

[0067] Otra realización contempla un uso de los anticuerpos descritos en la presente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto con un trastorno asociado con CD40 en donde la unión del anticuerpo o fragmento de unión de antígenos en dicho medicamento a CD40 inhibe el crecimiento o diferenciación de células del trastorno asociado con CD40.

[0068] El medicamento puede fabricarse para uso en el tratamiento de células de un trastorno asociado con CD40 seleccionado a partir de células linfoblastoides B, células pancreáticas, células pulmonares, células de mama, células de ovario, células de colon, células de

próstata, células dérmicas, células de cabeza y cuello, células de vejiga, células óseas o células renales.

[0069] El medicamento puede fabricarse para uso en el tratamiento de leucemia linfocítica crónica, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, linfoma de células T, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, macroglobulinemia de Waldenstrom o sarcoma de Kaposi.

[0070] Otra realización contempla un uso de anticuerpos de la invención en la fabricación de un medicamento para inducir la reducción de linfocitos B periféricos en donde el anticuerpo o fragmento de unión de antígenos del medicamento se fija específicamente a un antígeno CD40 de superficie celular humana, en donde la unión del anticuerpo o fragmento de unión de antígenos para el antígeno CD40 induce la reducción de las células.

[0071] El medicamento puede fabricarse para uso en el tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno inmune.

[0072] El medicamento puede fabricarse para uso en el tratamiento de artritis reumatoide o lupus eritematoso sistémico.

[0073] Otra realización contempla un uso de anticuerpos de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de artritis reumatoide en un sujeto.

[0074] El medicamento puede fabricarse para su uso en la inhibición de la diferenciación de linfocitos B y cambios de isotipos de anticuerpos en dicho sujeto.

[0075] El medicamento puede fabricarse para su uso en la inhibición de la producción de citoquinas y quimioquinas y la regulación positiva de moléculas de adhesión en células T y macrófagos en dicho sujeto.

[0076] El medicamento puede fabricarse para su uso en la inhibición de la activación de células dendríticas en dicho sujeto.

[0077] El medicamento puede fabricarse para su uso en la inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, metaloproteinasas de matriz, prostaglandinas, y regulación negativa de moléculas de adhesión en células no inmunes en dicho sujeto.

[0078] En ciertas realizaciones, el medicamento se fabrica como un medicamento de combinación para administrarse en combinación con un régimen que comprende la administración de metotrexato y/o la administración de Enbrel/Humira.

[0079] En otras realizaciones, el medicamento se fabrica como un medicamento de combinación y el medicamento además de comprender los anticuerpos de la invención comprende también un agente anti-TNF.

BREVE DESCRIPCIÓN DE VARIAS VISTAS DE LOS DIBUJOS

[0080] Figura 1: A. Curvas de unión y valores CE50 correspondientes de anticuerpos humanizados en células HEK-293 transfectadas con CD40 registrado mediante citometría de flujo. B. Comparación de unión del anticuerpo A, anticuerpo B y Anticuerpo C a células HEK transfectadas con CD40 registrado mediante citometría de flujo. Se muestran datos representativos para un experimento.

[0081] Figura 2: Curvas de unión y valores CE50 correspondientes de anticuerpos humanizados sobre células RAMOS medidos por citometría de flujo. Se muestran datos representativos para un experimento.

[0082] Figura 3: Pruebas de anticuerpos murinos y humanizados para actividad antagonista en un ensayo de proliferación de linfocitos B humano primarios. (A) Curvas de titulación de anticuerpos representativos y valores IC50 resultantes se representan para cada anticuerpo precursor murino. Se muestran datos representativos para un donante. (B) Superposición de las curvas de inhibición que ilustran antagonismo de varios anticuerpos anti-CD40 humanizados en comparación con 4D11.

[0083] Figura 4: Resumen de los resultados de las pruebas de anticuerpos humanizados para actividad antagonista (IC50) y agonista (SI = índice de estimulación) en un ensayo de proliferación de linfocitos B humano primario. Se muestran varios anticuerpos anti-CD40, 4D11, G28.5 y 5D12 para comparación.

[0084] Figura 5: Pruebas de Anticuerpo B, Anticuerpo A y Anticuerpo C para inhibición de la regulación positiva de CD86 inducida por CD40 de ensayos de sangre entera humana. Se

muestra el anticuerpo anti-CD40 4D11 para comparación. El control de isotipo IgG1 no mostró efectos en este ensayo. Se mostraron datos representativos para un donante.

[0085] Figura 6: Resumen de los resultados de las pruebas de anticuerpos B para la inhibición de regulación positiva de CD86 inducida por CD40 sobre linfocitos B purificados humanos y sangre entera humana. Se presentan los datos en ambos puntos (A) CI50 y (B) IC90. El control del isotipo IgG1 mostró ningún efecto en ningún ensayo. Datos para múltiples donantes (n = 4-5) se resumen en la tabla.

[0086] Figura 7: Pruebas sobre el Anticuerpos B, Anticuerpo A y anticuerpos C para inhibición de regulación positiva de CD86 inducida por CD40 en ensayos de sangre entera de mono cynomolgus. El control del isotipo IgG1 no mostró efectos en este ensayo. Se mostraron datos representativos para un donante.

[0087] Figura 8: Curvas gráficas de concentración en plasma y tiempo para Anticuerpo A (panel izquierdo) y Anticuerpo B (panel derecho) en monos cynomolgus seguido de la administración de 1 y 10 mg/kg de cada anticuerpo. Los datos son el resumen de la administración en 3 animales para cada anticuerpo.

[0088] Figura 9: Cambio porcentual de linfocitos B CD86-positivos en monos cynomolgus antes de la administración de (Anticuerpo B) y (Anticuerpo A) y en 3 puntos de tiempo después del tratamiento con cada anticuerpo. El Anticuerpo B (paneles superiores) y Anticuerpo A se administraron a 3 animales cada uno con 1 mg/kg (paneles izquierdos) o 10 mg/kg (paneles derechos).

[0089] Figura 10: niveles de (A) IgG humano y (B) IgM humano en ratones NSG 2 semanas después de la inyección de 1.25×10^6 PBMC humano. Los ratones se trataron con vehículo, un control del isotipo y los anticuerpos Anticuerpos A, Anticuerpo B y Anticuerpo C a una dosis de 1 mg/kg un día antes de la transferencia de PBMC humano

[0090] Figura 11: Unión de varios anticuerpos CD40 anti-humanos de ratón a plaquetas humanas.

[0091] Figura 12: Resumen de los resultados de la comparación de unión del Anticuerpo B al mAb anti-CD40 4D11 sobre linfocitos B humanos y plaquetas en sangre entera.

[0092] Figura 13: Actividad ADCC con constructos IgG1 knock-out y tipo silvestre

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0093] La señalización mediada por CD40 se reconoce ahora como implicada en una variedad de trastornos específicos. A pesar de la disponibilidad de una variedad de datos preclínicos que muestran que la intervención en estos trastornos sería terapéuticamente beneficiosa, sigue existiendo una necesidad de anticuerpos anti-CD40 antagonistas que puedan utilizarse en el tratamiento de enfermedades autoinmunes. La presente invención, en realizaciones preferidas se refiere a anticuerpos humanizados que reconocen CD40. En realizaciones específicas, la secuencia de estos anticuerpos humanizados se ha identificado con base en las secuencias de ciertos anticuerpos murinos de plomo.

[0094] Los términos "CD40" y "antígeno de superficie CD40" se refieren a una glicoproteína de 48 kD aproximadamente expresada sobre la superficie de linfocitos B normales y neoplásicos, que actúa como un receptor para señales implicadas en la proliferación y diferenciación celular (Ledbetter, 1987, J. Immunol. 138:788-785). Una molécula de ADNc que codifica CD40 se ha aislado a partir de una biblioteca preparada a partir de la línea celular de linfoma de Burkitt Raji (Stamenkovic et al., 1989, EMBO J. 8:1403).

[0095] Como se utiliza en la presente, una célula que expresa CD40 endógenamente es cualquier célula caracterizada por la expresión de superficie de CD40, incluyendo, pero sin limitar a, linfocitos B normales y neoplásicos, células interdigitantes, células epiteliales basales, células de carcinoma, macrófagos, células endoteliales, células dendríticas foliculares, células de amígdalas y células plasmáticas derivadas de médula ósea. En algunas realizaciones, la molécula CD40 es una molécula CD40 humana.

[0096] Los anticuerpos de la invención se fijan específicamente a CD40 recombinante y nativo humano. Un anticuerpo monoclonal humanizado en donde dicho anticuerpo se fija específicamente a CD40 humano que tiene un IC₅₀ de actividad antagonista menor de 1 nM y no tiene agonismo hasta 100 µg/ml en proliferación de linfocitos B y en donde dicho anticuerpo se caracteriza además en que el anticuerpo tiene una vida media *in vivo* en primates no humanos que es al menos 10 días.

[0097] Preferiblemente, el anticuerpo se fija específicamente a CD40 en conjugado CD40-Fc con CE₅₀ menor de 1 nM y CD40 en células que expresan CD40 con un EC₅₀ menor

de 2,5 nM. Las propiedades antagonistas del anticuerpo están definidas en cuanto a que tiene un IC₅₀ de actividad antagonista de linfocitos B o células dendríticas de menos de 1 nM. Además el anticuerpo tiene propiedades farmacocinéticas superiores que tienen una vida media aumentada in vivo en comparación con otros anticuerpos anti-CD40 (por ejemplo, anticuerpo anti-CD40 4D11).

[0098] Como se usa en la presente, una célula que expresa CD40 es cualquier célula caracterizada por la expresión de superficie de CD40, incluyendo, pero no limitado a, linfocitos B normales y neoplásicos, células interdigitantes, células epiteliales basales, células de carcinoma, macrófagos, células endoteliales, células dendríticas foliculares, células de amígdalas y células plasmáticas derivadas de médula ósea. En algunas realizaciones, la molécula CD40 es una molécula CD40 humana.

[0099] Los anticuerpos de la presente invención reconocen "epítipo de antígeno CD40" específico y "epítipo CD40". Tal como se utilizan en la presente estos términos se refieren a una molécula (por ejemplo, un péptido) o un fragmento de una molécula capaz de inmunorreactividad con un anticuerpo anti-CD40 y, por ejemplo, incluyen un determinante antigénico de CD40 reconocido por cualquiera de los anticuerpos que tienen una combinación de secuencias de cadena pesada/cadena ligera de la SEQ ID NO.26 de cadena ligera con cualquiera de las SEQ ID NOs: 27, 28, 29 o 30 de cadena pesada, o la SEQ ID NO: 31 de cadena ligera con cualquiera de las SEQ ID NOs 32, 33, 34 o 35 de cadena pesada, o la SEQ ID NO 36 de cadena ligera con cualquiera de las SEQ ID NOs 37, 38, 39 o 40 de cadena pesada. Epítopos antigénicos CD40 pueden incluirse en proteínas, fragmentos de proteínas, péptidos o similares. Los epítopos son en su mayoría comúnmente proteínas, oligopéptidos cortos, miméticos de oligopéptidos (es decir, compuestos orgánicos que imitan las propiedades de unión del anticuerpo del antígeno CD40), o combinaciones de los mismos.

[00100] La estructura generalizada de anticuerpos o inmunoglobulina es bien conocida por los expertos en la técnica, estas moléculas son glicoproteínas heterotetraméricas, típicamente de 150.000 daltons aproximadamente, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está fijada covalentemente a una cadena pesada mediante un enlace de disulfuro para formar un heterodímero, y la molécula heterotetramérica se forma a través de un enlace de disulfuro covalente entre las dos cadenas

pesadas idénticas de los heterodímeros. Aunque las cadenas ligeras y pesadas están unidas entre sí por un enlace de disulfuro, el número de enlaces de disulfuro entre las dos cadenas pesadas varía por el isotipo de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes de disulfuro intracatenarios espaciados de manera regular. Cada cadena pesada tiene en el extremo amino un dominio variable (V_H), seguido por tres o cuatro dominios constantes (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} y C_{H4}), así como una región de bisagra entre C_{H1} y C_{H2} . Cada cadena ligera tiene dos dominios, un dominio variable de extremo amino (V_L) y un dominio constante de extremo carboxilo (C_L). El dominio V_L se asocia de forma no covalente con el dominio V_H , mientras el dominio C_L se une comúnmente de manera covalente al dominio C_{H1} mediante un enlace de disulfuro. Se cree que residuos aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y pesada (Chothia, 1985, J. Mol. Biol. 186:651-663.)

[00101] Ciertos dominios dentro de los dominios variables difieren ampliamente entre diferentes anticuerpos, es decir, son "hipervariables". Estos dominios hipervariables contienen residuos que están directamente implicados en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su determinante antigénico específico. Hipervariabilidad, tanto en los dominios variables de cadena ligera como de cadena pesada, se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (CDRs) o bucles hipervariables (HVL). Las CDR se definen por comparación de secuencias en Kabat, 1991, En: Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md, mientras los HVL se definen estructuralmente de acuerdo con la estructura tridimensional del dominio variable, como se describe por Chothia y Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917. Cuando estos dos métodos resultan en identificaciones ligeramente diferentes de una CDR, se prefiere la definición estructural. Tal como se define por Kabat, la CDR-L1 se coloca en los residuos 24-34 aproximadamente, la CDR-L2, en los residuos 50-56 aproximadamente, y la CDR-L3, en los residuos 89-97 aproximadamente en el dominio variable de cadena ligera; la CDR-H1 es posicionada en los residuos 31-35 aproximadamente, CDR-H2 en los residuos 50-65 aproximadamente, y CDR-H3 en los restos 95-102 aproximadamente en el dominio variable de la cadena pesada. La CDR1, CDR2, CDR3 de las cadenas pesadas y ligeras por lo tanto definen las propiedades únicas y funcionales específicas para un anticuerpo dado.

[00102] Las tres CDR en cada una de las cadenas pesadas y ligeras están separadas por regiones variables (FR), que contienen secuencias que tienden a ser menos variables. Desde el

extremo amino al extremo carboxilo de los dominios variables de cadena pesada y ligera, las FR y CDR se organizan en el orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y FR4. La configuración hoja- β en su mayor parte de las regiones variables lleva las CDRs dentro de cada una de las cadenas en estrecha proximidad entre sí, así como a las CDR de la otra cadena. La conformación resultante contribuye al sitio de unión de antígenos (véase Kabat, 1991, NIH Publ. No. 91-3242, vol. I, páginas 647-669), aunque no todos los residuos de CDR están necesariamente implicados directamente en la unión al antígeno.

[00103] Residuos FR y dominios constantes Ig no están implicados directamente en la unión al antígeno, pero contribuyen en la unión al antígeno y/o median en la función efectora de los anticuerpos. Algunos residuos FR se cree que tienen un efecto significativo sobre la unión al antígeno en al menos tres maneras: al unirse de manera no covalente directamente a un epítipo, al interactuar con uno o más residuos de CDR, y al afectar la interfaz entre las cadenas pesadas y ligeras. Los dominios constantes no están directamente implicados en la unión al antígeno pero median las diversas funciones efectoras de Ig, tales como la participación del anticuerpo en citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP).

[00104] Las cadenas ligeras de inmunoglobulinas vertebradas se asignan a una de dos clases claramente diferentes, kappa (κ) y lambda (λ), con base en la secuencia de aminoácidos del dominio constante. En comparación, las cadenas pesadas de inmunoglobulinas mamíferas se asignan a una de cinco clases principales, de acuerdo con la secuencia de dominios constantes: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM. IgG e IgA se dividen además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan μ , δ , ϵ , γ , y α , , respectivamente. Las estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales de las clases de inmunoglobulinas nativas son bien conocidas.

[00105] Los términos, "anticuerpo", " anticuerpo anti-CD40", " anticuerpo anti-CD40 humanizado " y " anticuerpo variante anti-CD40 humanizado variante " se utilizan en la presente en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa) , anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos, tales

como dominios variables y otras porciones de anticuerpos que presentan una actividad biológica deseada, por ejemplo, la unión de CD40.

[00106] El término "anticuerpo monoclonal" (mAb) se refiere a un anticuerpo de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales en esa población son idénticos excepto por mutaciones que ocurren naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un solo determinante antigénico, un "epítipo". Por lo tanto, el modificador "monoclonal" es indicativo de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos dirigidos al epítipo idéntico y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier método particular. Se debe entender que los anticuerpos monoclonales pueden fabricarse mediante cualquier técnica o metodología conocida en la técnica, incluyendo por ejemplo, el procedimiento de hibridoma (Kohler, 1975, *Nature* 256:495.), o métodos de ADN recombinante conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Patente de EE.UU. N ° 4.816.567.), o métodos de aislamiento de anticuerpos monoclonales recombinantemente producidos usando bibliotecas de anticuerpos sobre fagos, usando técnicas descritas en Clackson, 1991, *Nature* 352: 624-628, y Marks, 1991, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597.

[00107] Los anticuerpos quiméricos consisten en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo de una especie (por ejemplo, un mamífero no humano tal como un ratón) y las regiones constantes de cadena pesada y ligera del anticuerpo de otra especie (por ejemplo, humano) y pueden obtenerse mediante la unión de secuencias de ADN que codifican las regiones variables del anticuerpo de la primera especie (por ejemplo, ratón) a las secuencias de ADN para las regiones constantes del anticuerpo de la segunda especie (por ejemplo, humana) y que transforma un huésped con un vector de expresión que contiene las secuencias unidas para permitir que se produzca un anticuerpo quimérico. Alternativamente, el anticuerpo quimérico puede ser también uno en el cual una o más regiones o dominios de la cadena pesada y/o ligera es idéntica, homóloga, o una variante de la secuencia correspondiente en un anticuerpo monoclonal de otra clase o isotipo de inmunoglobulina, o a partir de una secuencia de consenso o de línea germinal. Los anticuerpos quiméricos pueden incluir fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que el fragmento del anticuerpo exhiba la actividad biológica deseada de su anticuerpo precursor, por ejemplo la unión al mismo epítipo (véase, por ejemplo, Patente de EE.UU. N ° 4.816.567;..., Y Morrison, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 81:6851-6855).

[00108] Los términos "fragmento de anticuerpo", " fragmento de anticuerpo anti-CD40", " fragmento de anticuerpo anti-CD40 humanizado ", " fragmento variante de anticuerpo anti-CD40 humanizado " se refieren a una porción de un anticuerpo anti-CD40 de longitud completa, en donde una región variable, o una capacidad funcional se conserva, por ejemplo, la unión específica del epítopo CD40. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, un fragmento de Fab, Fab ', F (ab') ₂, Fd, Fv, scFv y scFv-Fc, un diacuerpo, un anticuerpo lineal, un anticuerpo de cadena sencilla, un minicuerpo, un diacuerpo formado a partir de fragmentos del anticuerpo, y anticuerpos multiespecíficos formados por fragmentos del anticuerpo.

[00109] Los anticuerpos de longitud completa pueden tratarse con enzimas tales como papaína o pepsina para generar fragmentos de anticuerpos útiles. La digestión de papaína se utiliza para producir dos fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno idénticos llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento residual "Fc". El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el dominio C_{H1} de la cadena pesada. Tratamiento con pepsina proporciona un fragmento F (ab ') ₂ que tiene dos sitios de unión a antígeno y es aún capaz de entrecruzar el antígeno.

[00110] Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la presencia de residuos adicionales, incluyendo una o más cisteínas de la región de bisagra de anticuerpos en el extremo C del dominio C_{H1}. Fragmentos de anticuerpos F (ab')₂ son pares de fragmentos Fab' unidos por residuos de cisteína en la región de bisagra. Otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos también son conocidos.

[00111] Un fragmento "Fv" contiene un sitio de unión y reconocimiento de antígeno completo el cual consiste de un dímero de dominio variable de cadena pesada y ligera en asociación no covalente ajustada. En esta configuración, las tres CDRs de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión de antígenos sobre la superficie del dímero V_H-V_L. Colectivamente, las seis CDRs confieren al anticuerpo la especificidad de unión con antígenos.

[00112] Un fragmento de anticuerpos "Fv de cadena sencilla" o "scFv" es una variante Fv de cadena sencilla que comprende los dominios V_H y V_L de un anticuerpo donde los dominios están presentes en una cadena polipeptídica sencilla. El Fv de cadena sencilla tiene la capacidad de reconocer y fijar antígenos. El polipéptido scFv también puede opcionalmente contener un

enlazador polipeptídico situado entre los dominios V_H y V_L con el fin de facilitar la formación de una estructura tridimensional deseada para la unión al antígeno por el scFv (véase, por ejemplo, Pluckthun, 1994, en *The Pharmacology of monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp 269-315).

[00113] Otros fragmentos de anticuerpos reconocidos incluyen los que comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V_H - C_{H1} - V_H - C_{H1}) para formar un par de regiones de unión al antígeno. Estos "anticuerpos lineales" pueden ser biespecíficos o monoespecíficos como se describe en, por ejemplo, Zapata. 1995, *Protein Eng.* 8 (10) :1057-1062.

[00114] Un anticuerpo humanizado o un fragmento de anticuerpo humanizado es un tipo específico de anticuerpo quimérico que incluye una variante de secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina, o un fragmento de la misma, que es capaz de unirse a un antígeno predeterminado y que comprende una o más FRs que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una o más CDRs que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana. Esta secuencia de aminoácidos no humana a menudo conocida como una secuencia "importada" se toma típicamente a partir de un dominio de anticuerpo "importado", en particular un dominio variable. En general, un anticuerpo humanizado incluye al menos las CDRs o HVLs de un anticuerpo no humano, insertado entre las FRs de un dominio variable de cadena humana pesada o ligera. La presente invención describe anticuerpos anti-CD40 humanizados específicos que contienen CDRs derivadas a partir de anticuerpos monoclonales murinos mostrados en las Tablas 3 y 4 insertados entre las FRs de los dominios variables de cadena pesada y ligera de secuencia de línea germinal humana. Se entiende que ciertos residuos de FR murinos pueden ser importantes para la función de los anticuerpos humanizados y por lo tanto ciertos residuos de dominios variables de cadena pesada y ligera de secuencia de línea germinal humana se modifican para ser los mismos que los de secuencia murina correspondiente.

[00115] En otro aspecto, un anticuerpo anti-CD40 humanizado comprende sustancialmente la totalidad del menos uno, y típicamente dos, dominios variables (tales como los contenidos, por ejemplo, en los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, y Fv) en los cuales todas las CDRs corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana, y específicamente en la presente, todas las CDRs son secuencias murinas, como se detalla en las Tablas 1 a 4 a

continuación en la presente y todas las FRs son aquellas de una secuencia de consenso o de línea germinal de inmunoglobulina humana. En otro aspecto, un anticuerpo anti-CD40 humanizado también incluye al menos una porción de una región Fc de inmunoglobulina, típicamente de una inmunoglobulina humana. Normalmente, el anticuerpo contiene tanto la cadena ligera, así como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir una o más de las regiones de C_{H1}, bisagra, C_{H2}, C_{H3}, y/o C_{H4} de cadena pesada, según sea apropiado.

[00116] Un anticuerpo anti-CD40 humanizado se puede seleccionar a partir de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ y IgA₂. Por ejemplo, el dominio constante puede ser un dominio constante fijador de complemento donde se desea que el anticuerpo humanizado exhiba actividad citotóxica, y el isotipo es típicamente IgG₁. Cuando tal actividad citotóxica no es deseable, el dominio constante puede ser de otro isotipo, por ejemplo, IgG₂. Un anticuerpo anti-CD40 humanizado alternativo puede comprender secuencias de más de una clase de inmunoglobulina o isotipo, y seleccionar dominios constantes particulares para optimizar las funciones efectoras deseadas está dentro de la habilidad común en el estado de la técnica. En realizaciones específicas, la presente invención proporciona anticuerpos que son anticuerpos IgG1 y, más particularmente, son anticuerpos IgG1 en donde ha habido una inactivación (*knock-out*) de las funciones efectoras.

[00117] Las FRs y CDRs, o HVLs, de un anticuerpo anti-CD40 humanizado no necesitan corresponder precisamente a las secuencias precursoras. Por ejemplo, uno o más residuos en la CDR importada, o HVL, o secuencia FR de consenso o línea germinal puede alterarse (por ejemplo, mutagenizadas) mediante sustitución, inserción o supresión de manera que el residuo aminoácido resultante ya no sea idéntico al residuo original en la posición correspondiente en cualquier secuencia precursora, pero el anticuerpo no obstante, conserva la función de unión a CD40. Tal alteración típicamente no sería extensa y serían más bien alteraciones conservadoras. Usualmente, al menos el 75% de los residuos de anticuerpos humanizados corresponderá a aquellos de las FRs de consenso o línea germinal precursoras y secuencias de CDRs importadas, y a menudo al menos del 90%, y frecuentemente más del 95%, o más del 98% o más del 99%.

[00118] Residuos de inmunoglobulinas que afectan la interfaz entre las regiones variables de cadena pesada y ligera ("la interfaz V_L-V_H") son los que afectan la proximidad u orientación

de las dos cadenas con respecto a la otra. Ciertos residuos que pueden estar implicados en interacciones intercatenarias incluyen residuos V_L 34, 36, 38, 44, 46, 87, 89, 91, 96 y 98 y residuos V_H 35, 37, 39, 45, 47, 91, 93, 95, 100, y 103 (utilizando el sistema de numeración expuesto en Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987)). La EE.UU. Pat. N° 6.407.213 también describe que residuos, tales como los residuos V_L 43 y 85, y residuos V_H 43 y 60 también pueden estar implicados en esta interacción. Mientras estos residuos se indican solo para IgG humano, son aplicables entre especies. Residuos de anticuerpos importantes que razonablemente se espera estén involucrados en interacciones intercatenarias se seleccionan para sustitución en la secuencia de consenso.

[00119] Los términos "secuencia de consenso" y "anticuerpo de consenso" se refieren a una secuencia de aminoácidos que comprende el residuo de aminoácidos que ocurre con mayor frecuencia en cada posición en todas las inmunoglobulinas de cualquier clase, isotipo, o estructura de subunidad particular, por ejemplo, un dominio variable de inmunoglobulina humana. La secuencia de consenso puede basarse en inmunoglobulinas de una especie o de muchas especies particulares. Se entiende que una secuencia, estructura o anticuerpo de "consenso" abarca una secuencia de consenso humana como se describe en ciertas realizaciones, y para referirse a una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos de aminoácidos que ocurren con mayor frecuencia en cada posición en todas las inmunoglobulinas humanas de cualquier clase, isotipo, o estructura de subunidad particular. Por lo tanto, la secuencia de consenso contiene una secuencia de aminoácidos que tiene en cada posición un aminoácido que está presente en una o más inmunoglobulinas conocidas, pero que no puede duplicar exactamente la secuencia de aminoácidos completa de cualquier inmunoglobulina sola. La secuencia de consenso de la región variable no se obtiene de cualquier anticuerpo o inmunoglobulina producido naturalmente. Kabat, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a edición. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., y variantes de los mismos. Las FRs de secuencias de consenso de cadena pesada y ligera, y variantes de las mismas, proporcionan secuencias útiles para la preparación de anticuerpos anti-CD40 humanizados. Véase, por ejemplo, las patentes EE.UU. Nos. 6.037.454 y 6.054.297.

[00120] Las secuencias de línea germinal humana se encuentran de forma natural en la población humana. Una combinación de aquellos genes de línea germinal genera diversidad de anticuerpos. Secuencias de anticuerpos de línea germinal para la cadena ligera del anticuerpo

proviene de genes v y genes j kappa o lambda de la línea germinal humana conservada. Del mismo modo las secuencias de cadena pesada provienen de genes v, d y j de línea germinal (Lefranc, MP, y Lefranc, G, " The Immunoglobulin Facts Book" Academic Press, 2001).

[00121] Como se usa en la presente, "variante", " variante anti-CD40", " variante anti-CD40 humanizada", o " variante humanizada anti-CD40 " cada uno se refiere a un anticuerpo anti-CD40 humanizado que tiene al menos una CDR murina variable de cadena pesada de cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 1 a 4 o una secuencia CDR murina de cadena ligera derivada del anticuerpo monoclonal murino como se muestra en cualquiera de las SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 8 y las secuencias de FR derivadas de secuencias de consenso humano. Las variantes incluyen aquellas que tienen uno o más cambios de aminoácidos en uno o ambos dominios variables de cadena ligera o cadena pesada, siempre que el cambio de aminoácidos no afecte sustancialmente la unión del anticuerpo a CD40. Anticuerpos humanizados de ejemplo producidos en la presente incluyen a aquellos designados como Anticuerpo A, Anticuerpo B, y Anticuerpo C y las diferentes secuencias de cadena pesada y ligera de la misma se muestran en las SEQ ID NO 26 a SEQ ID NO: 40.

[00122] Un anticuerpo "aislado" es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes del entorno natural del anticuerpo son aquellos materiales que pueden interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden ser enzimas, hormonas, o otros solutos proteicos o no proteicos. En un aspecto, el anticuerpo se purificará al menos a más del 95 % de aislamiento por peso del anticuerpo.

[00123] Un anticuerpo aislado incluye un anticuerpo in situ dentro de células recombinantes en las cuales se produce, puesto que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no está presente. Normalmente sin embargo, un anticuerpo aislado por lo menos se preparará mediante una etapa de purificación en la que el material celular recombinante es retirado.

[00124] El término "desempeño del anticuerpo" se refiere a factores que contribuyen al reconocimiento de anticuerpos de antígenos o a la eficacia de un anticuerpo in vivo. Los cambios en la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo pueden afectar las propiedades de los anticuerpos, tales como el plegado, y pueden influir en factores físicos tales como la tasa inicial

de unión del anticuerpo al antígeno (k_a), constante de disociación del anticuerpo desde el antígeno (k_d), afinidad constante del anticuerpo para el antígeno (K_d), conformación del anticuerpo, estabilidad de la proteína, y vida media del anticuerpo.

[00125] El término "epítipo etiquetado" cuando se utiliza en la presente, se refiere a un anticuerpo anti-CD40 fusionado a una "etiqueta de epítipo". Una "etiqueta de epítipo" es un polipéptido que tiene un número suficiente de aminoácidos para proporcionar un epítipo para la producción de anticuerpos, sin embargo, está diseñado de tal manera que no interfiere con la actividad deseada del anticuerpo anti-CD40 humanizado. La etiqueta de epítipo es usualmente suficientemente única de tal modo que un anticuerpo enfrentado con una etiqueta de epítipo no se entrecruza de manera cruzada con otros epítipos. Polipéptidos de etiqueta adecuados generalmente contienen al menos 6 residuos aminoácidos, y usualmente contienen de 8 a 50 residuos aminoácidos aproximadamente, o de 9 a 30 residuos aproximadamente. Ejemplos de etiquetas de epítipo y el anticuerpo que fija el epítipo incluyen el polipéptido de la etiqueta HA de la influenza y su anticuerpo 12CA5 (Field, 1988 Mol Cell Biol 8: 2159-2165; etiqueta c-myc y anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 de los mismos (Evan, 1985, Mol Cell Biol 5 (12):3610-3616; y etiqueta (gD) de glicoproteína D del virus de Herpes simplex y su anticuerpo (Paborsky 1990. , Protein Engineering 3 (6):547-553) En ciertas realizaciones, la etiqueta epitópica es un "epítipo de unión del receptor de salvamento" como se utiliza en la presente, el término "epítipo de unión del receptor de salvamento" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula IgG (tales como IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable de incrementar la vida media sérica in vivo de la molécula IgG.

[00126] En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención pueden conjugarse con un agente citotóxico. Es decir cualquier sustancia que inhibe o evita la función de las células y/o causa la destrucción de las células. El término se utiliza para incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, y Re¹⁸⁶), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal y fragmentos de los mismos. Tales agentes citotóxicos pueden ser acoplados a los anticuerpos humanizados de la presente invención utilizando procedimientos estándar, y se utilizan, por ejemplo, para tratar a un paciente a quien se indique terapia con el anticuerpo.

[00127] Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Existen numerosos ejemplos de agentes quimioterapéuticos que pueden estar conjugados con los anticuerpos terapéuticos de la presente invención. Ejemplos de tales agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida, sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfan y piposulfan; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacin y bullatacinona); camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; callistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina, auristatinas, (incluyendo los análogos monometil-auristatina E y monometil-auristatina F); duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucil, clomafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichin, fenesterina, prednimustina; trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gammaII y caliqueamicina phiII, véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl, 33:183-186; dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; esperamicina, así como cromóforo de neocarzinostatina y relacionados cromóforos antibióticos de la cromoproteína enediina), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (Adriamycin TM) (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, y deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU), análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como

ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutenetimida, mitotano, trilostano; recargador de ácido fólico tales como ácido folínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; democolcina; diaziquona; elfomitina; acetato de eliptinio; una epotilona; nitrato de galio; etoglúcido; hidroxiaurea; lentinan; lonidamina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona, mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico, 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK ®; razoxano; rizoxina; sizofuran; espirogermanio, ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2', 2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitabronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL ®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y doxetaxel (TAXOTERE ®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); clorambucilo; gemcitabina (GemzarTM); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina NavelbineTM); novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; Inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición los agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores tales como anti-estrógenos y moduladores selectivos de receptores de estrógeno (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NolvadexTM), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (FarestonTM); inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima de aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4 (5)-imidazoles, aminoglutenetimida, acetato de megestrol (MegaceTM), exemestano, formestano, fadrozol, vorozol (RivisorTM), letrozol (FemaraTM), y anastrozol (ArimidexTM), y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. Uno o más de estos agentes

pueden conjugarse a los anticuerpos humanizados de la presente invención para proporcionar un agente terapéutico útil para el tratamiento de diversos trastornos.

[00128] Los anticuerpos también pueden conjugarse con profármacos. Un "profármaco" es un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales en comparación con el fármaco precursor y es capaz de ser activado o convertido enzimáticamente en la forma más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, 1986, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery, In: "Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press. Profármacos útiles incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con aminoácidos D, profármacos glicosilados, profármacos que contienen β -lactámicos, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida, y profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden convertirse en un fármaco libre citotóxico más activo. Ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma de profármaco incluyen, pero no se limitan a, aquellos agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

[00129] Para el diagnóstico, así como fines terapéuticos de monitoreo, los anticuerpos de la invención también pueden conjugarse con una etiqueta, ya sea una sola etiqueta o una etiqueta y un segundo agente adicional (profármaco, agente quimioterapéutico y similares). Una etiqueta, como se diferencia a partir del segundo agente se refiere a un agente que es un compuesto o composición detectable y que se puede conjugar directamente o indirectamente a un anticuerpo humanizado de la presente invención. La etiqueta misma puede ser detectable (por ejemplo, etiquetas de radioisótopos o etiquetas fluorescentes) o, en el caso de una etiqueta enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable. El anticuerpo anti-CD40 humanizado etiquetado puede prepararse y utilizarse en varias aplicaciones incluyendo diagnósticos in vitro y in vivo.

[00130] Los anticuerpos de la presente invención pueden formularse como parte de una preparación liposomal con el fin de efectuar la entrega in vivo de los mismos. Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o surfactantes. Los liposomas son útiles para administrar a un mamífero un compuesto o formulación, tal como un

anticuerpo anti-CD40 humanizado descrito en la presente, opcionalmente, junto a o en combinación con uno o más agentes farmacéuticamente activos y/o etiquetas. Los componentes del liposoma están comúnmente dispuestos en una formación de bicapa, similar a la disposición de lípidos de membranas biológicas.

[00131] Ciertos aspectos de la presente invención se relacionan con ácidos nucleicos aislados que codifican uno o más dominios de los anticuerpos humanizados de la presente invención. Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la cual está asociada normalmente en la fuente natural del ácido nucleico del anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada se distingue de la molécula de ácido nucleico tal como existe en las células naturales.

[00132] En diversos aspectos de la presente invención uno o más dominios de los anticuerpos humanizados se expresan de forma recombinante. Tal expresión recombinante puede emplear una o más secuencias de control, es decir, secuencias de polinucleótidos necesarias para la expresión de una secuencia codificadora unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de control adecuadas para su uso en células procariotas incluyen, por ejemplo, secuencias promotor, secuencias de la región del operador y secuencias de sitio de unión de ribosomas. Secuencias de control eucariotas incluyen, pero no se limitan a, promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores. Estas secuencias de control pueden utilizarse en la expresión y producción del anticuerpo anti-CD40 humanizado en células huésped procariotas y eucariotas.

[00133] Una secuencia de ácido nucleico está "unida operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, una pre-secuencia de ácido nucleico o líder secretorio está unida operativamente a un ácido nucleico que codifica un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia, o una sitio de unión de ribosomas está unido operativamente a una secuencia codificadora si está colocado de modo que facilite la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas, y, en el caso de un líder secretorio, contiguo y dentro del marco de lectura. Sin embargo, los potenciadores son

opcionalmente contiguos. La unión puede realizarse mediante ligadura en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, pueden utilizarse adaptadores o enlazadores oligonucleótidos sintéticos.

[00134] Como se usa en la presente, las expresiones "célula", "línea celular", y "cultivo celular" se usan indistintamente y todas estas designaciones incluyen la progenie de la misma. Por lo tanto, "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula del sujeto primario y cultivos derivados de los mismos sin tener en cuenta el número de transferencias.

[00135] El término "mamífero" para propósitos del tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja y animales de zoológico, animales deportivos o de compañía, tales como perros, caballos, gatos, vacas, y similares. Preferiblemente, el mamífero es humano.

[00136] Un "trastorno", como se utiliza en la presente, es cualquier condición la cual se beneficiaría del tratamiento con un anticuerpo anti-CD40 humanizado descrito en la presente. Esta incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas que incluyen aquellas condiciones patológicas que predisponen el mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos o trastornos no limitantes a tratar en la presente incluyen cáncer, neoplasias hematológicas, tumores benignos y malignos, leucemias y neoplasias linfoides y trastornos inflamatorios, angiogénicos, autoinmunes e inmunológicos.

[00137] Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un el crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia.

[00138] Tal como se utiliza en la presente, el término "trastorno asociado a CD40" o "enfermedad asociada a CD40" se refiere a una condición en la cual se indica la modificación o eliminación de células que expresan CD40. Estas incluyen células que expresan CD40 que demuestran proliferación anormal o células que expresan CD40 que están asociadas con el crecimiento canceroso o maligno. Ejemplos más particulares de cánceres que demuestran la expresión anormal del antígeno CD40 incluyen células linfoblastoides B, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, linfomas de células T, sarcoma de Kaposi, osteosarcoma, tumores epidérmicos y endoteliales, cáncer de páncreas, pulmón, mama, ovario, colon, próstata, cabeza y

cuello, piel (melanoma), vejiga y riñón. Tales trastornos incluyen, pero no se limitan a, leucemias, linfomas, incluyendo linfoma de linfocitos B y linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, tumores sólidos, incluyendo sarcomas, tales como osteosarcoma, sarcoma de Ewing, melanoma maligno, adenocarcinoma, incluyendo adenocarcinoma de ovario, sarcoma de Kaposi/tumor de Kaposi y carcinoma de células escamosas.

[00139] Un trastorno asociado a CD40 también incluye enfermedades y trastornos del sistema inmunológico, tales como enfermedades autoinmunes y trastornos inflamatorios. Tales condiciones incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide (AR), lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerodermia, síndrome de Sjogren, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedad intestinal inflamatoria (por ejemplo, colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn), inflamación pulmonar, asma, y púrpura trombocitopénica idiopática (ITP).

[00140] La frase "detiene el crecimiento de" o "inhibidor del crecimiento" cuando se utiliza en la presente se refiere a la inhibición del crecimiento o proliferación de una célula, especialmente un tipo de célula neoplásica que expresa el antígeno CD40. Por lo tanto, la inhibición del crecimiento, por ejemplo, reduce significativamente el porcentaje de células neoplásicas en la fase S.

[00141] El término "infusión intravenosa" se refiere a la introducción de un agente en la vena de un paciente animal o humano durante un período de tiempo superior a 15 minutos aproximadamente, generalmente entre 30 a 90 minutos aproximadamente.

[00142] El término "bolo intravenoso" o "pulso intravenoso" se refiere a la administración del fármaco en una vena de un animal o ser humano de tal manera que el cuerpo recibe el fármaco en 15 minutos o menos aproximadamente, generalmente 5 minutos o menos.

[00143] El término "administración subcutánea" se refiere a la introducción de un agente bajo la piel de un paciente animal o humano, preferiblemente dentro de un espacio entre la piel y el tejido subyacente, mediante la administración sostenida relativamente lenta a partir de un receptáculo farmacológico. Pellizcar o sujetar la piel y tirar de ella hacia arriba para alejarla de tejidos subyacentes podría crear estos espacios.

[00144] El término "infusión subcutánea" se refiere a la introducción de un fármaco bajo la piel de un paciente animal o humano, preferiblemente dentro de un espacio entre la piel y el tejido subyacente, mediante la administración relativamente lenta sostenida de un receptáculo farmacológico durante un período de tiempo que incluye, pero no se limita a, 30 minutos o menos, o 90 minutos o menos. Opcionalmente, la infusión puede realizarse por implantación subcutánea de una bomba de suministro de fármaco implantada bajo la piel del paciente animal o humano, en donde la bomba suministra una cantidad predeterminada de fármaco por un período de tiempo predeterminado, tal como 30 minutos, 90 minutos, o un período de tiempo que abarca la totalidad del régimen de tratamiento.

[00145] El término "bolo subcutáneo" se refiere a la administración de fármaco bajo la piel de un paciente animal o humano, donde la distribución del fármaco en bolo es menos de 15 minutos aproximadamente, en otro aspecto, es menos de 5 minutos, y en aún otro aspecto, es menos de 60 segundos. En aún otro aspecto, la distribución está dentro de un espacio entre la piel y el tejido subyacente, donde el espacio puede crearse al pellizcar o sujetar la piel y tirar de ella hacia arriba para alejarla de tejidos subyacentes.

[00146] El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se usa para referirse a una cantidad de un agente activo que alivia o mejora uno o más de los síntomas del trastorno a tratar. Al realizarlo, es precisamente aquella cantidad la cual tiene un resultado benéfico para el paciente, por ejemplo, un efecto de detención de crecimiento o provoca la eliminación de la célula. En un aspecto, la cantidad terapéuticamente efectiva tiene actividad apoptótica, o es capaz de inducir la muerte celular. En otro aspecto, la cantidad terapéuticamente efectiva se refiere a una concentración sérica diana que ha demostrado ser efectiva en, por ejemplo, ralentizar la progresión de la enfermedad. La eficacia puede medirse de formas convencionales, dependiendo de la condición a ser tratada. Por ejemplo, en enfermedades neoplásicas o trastornos caracterizados por células que expresan CD40, la eficacia puede medirse mediante la evaluación del tiempo hasta la progresión de la enfermedad, o determinando las tasas de respuesta.

[00147] Los términos "tratamiento" y "terapia" y similares, tal como se utilizan en la presente, pretenden incluir medidas terapéuticas, así como profilácticas, o de supresión de una enfermedad o trastorno que conduce a cualquier efecto clínicamente deseable o beneficioso, incluyendo, pero no limitado al alivio o mejoría de uno o más síntomas, regresión, retardo o cese

de la progresión de la enfermedad o trastorno. Por lo tanto, por ejemplo, el término tratamiento incluye la administración de un agente antes o después de la aparición de un síntoma de una enfermedad o trastorno evitando o eliminando uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno. Como otro ejemplo, el término incluye la administración de un agente después de la manifestación clínica de la enfermedad para combatir los síntomas de la enfermedad. Además, la administración de un agente después de la aparición y después de que los síntomas clínicos se hayan desarrollado donde la administración afecta los parámetros clínicos de la enfermedad o trastorno, tales como el grado de lesión tisular o la cantidad o extensión de la metástasis, ya sea que el tratamiento conduzca o no a la mejora de la enfermedad, comprende "terapia" o "tratamiento" como se usa en la presente. Por otra parte, siempre que las composiciones de la invención, ya sea solas o en combinación con otro agente terapéutico alivien o mejoren al menos un síntoma de un trastorno que está siendo tratado en comparación a los síntomas que en la ausencia del uso de la composición del anticuerpo CD40 humanizado, el resultado se debe considerar como un tratamiento efectivo de la enfermedad subyacente, independientemente de que todos los síntomas de la enfermedad sean aliviados o no.

[00148] El término "inserto en el empaque" se utiliza para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los paquetes comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, administración, contraindicaciones y/o advertencias referentes al uso de dichos productos terapéuticos.

[00149] Anticuerpos

[00150] Se describen y divulgan en la presente los anticuerpos anti-CD40 humanizados, y composiciones y artículos de fabricación que comprenden uno o más anticuerpos anti-CD40 humanizados de la presente invención. También se describen agentes de unión que incluyen un fragmento de unión de antígenos de un anticuerpo anti-CD40 humanizado. Los anticuerpos anti-CD40 humanizados y agentes de unión pueden detener el crecimiento de las células, provocar la eliminación de células que expresan CD40 o de otra manera inducir o provocar un efecto citotóxico o citostático sobre las células diana. Los anticuerpos anti-CD40 humanizados y agentes de unión pueden utilizarse en el tratamiento de una variedad de enfermedades o trastornos caracterizados por la proliferación de células que expresan el antígeno de superficie CD40. Un anticuerpo anti-CD40 humanizado y un agente de unión CD40 cada uno incluye al

menos una porción que reconoce específicamente un epítipo de CD40 (es decir, un fragmento de unión de antígenos).

[00151] En la caracterización se seleccionaron inicial anticuerpos murinos basándose en la caracterización de unión de CD40.

[00152] De estos estudios iniciales, se seleccionaron anticuerpos murinos que tuvieran las siguientes regiones variables de cadena pesada mostradas en la Tabla 1 y regiones variables de cadena ligera mostradas en la Tabla 2:

Tabla 1: Anticuerpos Lead (Plomo) Murinos CD40 – Secuencias VH

2H11	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDYIVHWVKQRPEKGLEWIGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSSNTAYLHLSSLTSED TAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO:1)
10F2	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDYIIHWVKQRPEKGLEWIGRIDPEDGDTKYDPKFQGKATMTADTSSNTAYLHLSSLTSED TAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTTTLTVSS(SEQ ID NO:2)
19B10	EVQLQQSGAELVRPGASVQLSCTASGFNIKDYIVHWVKQRPEKGLEWIGRIDPEDGDTKFAPKFQGKATMTADTSSNTVYLHLSSLTSED TAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTTTLTVSS(SEQ ID NO:3)
20E2	EVQLVESGGGLVKPGGSRKLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSED TALYYCARQDGYRYAMDYWGQGTSTVTVSS(SEQ ID NO:4)

TABLA 2: Anticuerpos Lead (Plomo) Murinos CD40 – Secuencias VK

	QIVLTQSPAIMASASPGEKVTITCSASSSVSYMLWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAAT YY
2H11	CQQRTFYPTYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:5)
	QIVLTQSPTIMASASPGEKVIITCSATSSVSYILWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGASYSLTISRMEAEDAATYY
10F2	CQQRTFYPTYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:6)
	QIVLTQSPAIMASASPGEKVTITCSASSSVSYMLWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATY
19B10	YCQQRTFYPTYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:7)
	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISN L
20E2	QAEDLAVYYCQNDYTYPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:8)

[00153] Secuencias de estructuras humanas fueron seleccionadas para cada uno de los anticuerpos murinos de plomo sobre la base en la homología de marco, estructura CDR, residuos canónicos conservados, residuos de empaquetamiento de interfaces conservados y otros parámetros.

[00154] Las CDRs murinas de cadena pesada y cadena ligera de los diferentes anticuerpos seleccionados, los anticuerpos se muestran en la Tabla 3 y Tabla 4, respectivamente:

Tabla 3:
Secuencias de CDR de cadena pesada

Nombre de constructo	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3
2S11	<u>GFNIKDYYVH</u>	<u>RIDPEDGDS</u> KYAPKFQG	SYVVGTYGY
	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 16
10F2	<u>GFNIKDYYIH</u>	<u>RIDPEDGDT</u> KYDPKFQG	<i>SYVVGTYGY</i>
	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 16
19B10	<u>GFNIKDYYVH</u>	<u>RIDPEDGDTK</u> FAPKFQG	<i>SYVVGTYGY</i>
	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 16
20E2	<u>GFTFSDYGMH</u>	<u>YISSGNRII</u> YADTVKG	<i>QDGYRYAMDY</i>
	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 17

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

Tabla 4:
Secuencias de CDR de cadena ligera

Nombre de constructo	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
2S11	<i><u>SASSSVSYML</u></i>	<i><u>STSNLAS</u></i>	<i><u>QORTFYPTY</u></i>
10F2	SEQ ID NO: 18 <i><u>SATSSVSYIL</u></i>	SEQ ID NO: 22 <i><u>STSNLAS</u></i>	SEQ ID NO: 24 <i><u>QORTFYPTY</u></i>
19B10	SEQ ID NO: 19 <i><u>SASSSVSYML</u></i>	SEQ ID NO: 22 <i><u>STSNLAS</u></i>	SEQ ID NO: 24 <i><u>QORTFYPTY</u></i>
20E2	SEQ ID NO: 20 <i><u>KSSQSLNLSGNQKNYLT</u></i>	SEQ ID NO: 22 <i><u>WTSTRES</u></i>	SEQ ID NO: 24 <i><u>QNDYTYPLT</u></i>
	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 25

Una vez más, el sistema de numeración de Chothia se utiliza en la Tabla 4 con La numeración de Kabats para las secuencias denotadas por el texto en negrita y cursiva y la numeración IMGT se muestra mediante el texto subrayado.

[00155] Los Fabs que mostraron una unión mejor o igual en comparación con el Fab quimérico precursor fueron seleccionados para conversión a IgG. Los clones de la serie 20E2 se convirtieron en dos formatos IgG diferentes: a) IgG4DM (mutante doble) tiene dos mutaciones en la región de bisagra/ Fc, Ser228Pro que reduce la formación de medias moléculas y Leu235Glu que reduce además la unión Fcγ R. b) IgG1KO (knock-out de funciones efectoras) tiene dos mutaciones en la región de Fc, Leu234Ala y Leu235Ala, las cuales reducen la función efectora, tales como Fcγ R y la unión del complemento. Ambos formatos IgG se describen en la literatura. El Ejemplo 1 describe la humanización de tres candidatos con más detalle. Los resultados de tal humanización resultaron en secuencias de anticuerpos humanizados, que tienen las secuencias de cadena pesada y ligera que se muestran a continuación:

Identidad	Secuencia	SEC ID NO:

Anticuerpo A (Cadena Ligera)	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCCKSSQSLLNSGNQKNYLTW</u> <u>HQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS</u> <u>SLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFI</u> FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	26
Anticuerpo A (Cadena pesada, IgG1KO)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGLTVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	27
Anticuerpo A (Cadena Pesada, IgG1)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGLTVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	28
Anticuerpo A (Cadena Pesada,	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGLTVTVSSASTK</u>	29

IgG4DM)	GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	
Anticuerpo A (Cadena Pesada, IgG1KOb)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS</u> <u>DYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISR</u> <u>DNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGLTVTVSS</u> <u>ASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	30
Anticuerpo B (Cadena Ligera)	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGEKVTINCKSSQSL</u> <u>LNSGNQKNYL</u> <u>TWHQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSGT</u> <u>DF</u> <u>LTISLQAEDVAVYYCONDYTYPLTFGGG</u> <u>TKVEIKRTVA</u> APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	31
Anticuerpo B (Cadena Pesada, IgG1KO)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS</u> <u>DYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISR</u> <u>DNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGLTVTVSS</u> <u>ASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	32
Anticuerpo B (Cadena Pesada, IgG1)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS</u> <u>DYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISR</u> <u>DNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGLTVTVSS</u> <u>ASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH	33

	NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
Anticuerpo B (Cadena Pesada, IgG4 DM)	<u>EVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASGFTFS DYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDN AKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGT LVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKRVE SKYGPCCPPCPAPEFE GGP SVFLFPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	34
Anticuerpo B (Cadena Pesada, IgG1KOb)	<u>EVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASGFTFS DYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDN AKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGT LVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	35
Anticuerpo C (Cadena Ligera)	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMLWFO</u> <u>OKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTL</u> <u>TISSLQPEDFATYYCQORTFYPYTFGGGT KVEIKRT</u> VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	36
Anticuerpo C (Cadena Pesada, IgG1KO)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQ GKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED TAVYYCTTSYYVGT YGYWGQGT LVTVSSASTKG</u> PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK	37

	LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
Anticuerpo C (Cadena Pesada, IgG1)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED</u> AVYYCTTSYYVGT YGYWGQ GLTVSS ASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	38
Anticuerpo C (Cadena Pesada, IgG4 DM)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED</u> AVYYCTTSYYVGT YGYWGQ GLTVSS ASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	39
Anticuerpo C (Cadena Pesada, IgG1KOb)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED</u> AVYYCTTSYYVGT YGYWGQ GLTVSS ASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	40

[00156] En algunas realizaciones, el fragmento de unión de antígenos puede, por ejemplo, bloquear la proliferación o de otro modo detener el crecimiento de una célula o causar su agotamiento, muerte, o de lo contrario su supresión, por ejemplo, a través de la unión del antígeno de superficie CD40. Por ejemplo, en neoplasias de linfocitos T y B, los efectos

antitumorales (por ejemplo, la detención del crecimiento con o sin supresión o apoptosis celular) a menudo ocurren cuando las células malignas se exponen a estímulos que conducen a la activación de los linfocitos normales. Esta detención del crecimiento inducida por la activación se ha observado con señales a través de ya sea receptores de antígenos o receptores coestimulatorios (véase, por ejemplo, Ashwell, 1987, Science 237:61; Bridges, 1987, J. Immunol 139:4242; Page y Defranco, 1988, J. Immunol 140:3717; y Beckwith, 1990, J. Natl Cancer Inst. 82:501). La estimulación de CD40, como resultado de la unión específica mediante cualquiera un anticuerpo o un ligando soluble, inhibe el crecimiento de linfoma de linfocitos B (véase, por ejemplo, Funakoshi et al., 1994, Blood 83:2787-2794). Los agentes que inhiben el crecimiento de células malignas de esta manera y que están dirigidos contra el antígeno de superficie CD40 son ejemplos de agentes adecuados.

[00157] Agentes específicos de CD40 incluyen un fragmento de unión de antígenos de un anticuerpo anti-CD40 humanizado que se une a CD40 (por ejemplo, CD40 humano o una variante del mismo). Los agentes y anticuerpos CD40 específicos pueden ser opcionalmente conjugados o fusionados a un agente citotóxico o quimioterapéutico. En aspectos donde el anticuerpo humanizado se une al antígeno de superficie CD40 y causa la depleción de los tipos celulares que expresan el CD40, la unión se caracteriza generalmente mediante un direccionamiento específico hacia la célula del antígeno de superficie CD40 in vivo. Agentes de unión adecuados unen el antígeno CD40 con suficiente afinidad y/o avidéz de forma que el agente específico de CD40 es útil como un agente terapéutico al abordar específicamente una célula que exprese el antígeno.

[00158] En algunos aspectos, el anticuerpo humanizado disminuye la unión del ligando de CD40 a CD40 en al menos un 45%, por lo menos 50%, por lo menos 60% o por lo menos 75% o al menos 80%, o al menos 90%, o al menos 95%.

[00159] En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados anti-CD40, incluyendo fragmentos de unión de antígenos de los mismos, tales como dominios variables de cadena pesada y ligera, comprenden una secuencia de aminoácidos de los residuos derivados del anticuerpo A del CDR (secuencia de cadena pesada = SEC ID NO: 27; SEC ID NO: 28, SEC ID NO: 29 o SEC ID NO: 30; secuencia de cadena ligera = SEC ID NO: 26), Anticuerpo B (secuencia de cadena pesada = SEC ID NO: 32, SEC ID NO: 33; SEC ID NO: 34, o SEC ID NO:

35; secuencia de cadena ligera = SEC ID NO: 31) y Anticuerpo C (secuencia de cadena pesada = SEC ID NO: 37, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 39 o SEC ID NO: 40; secuencia de cadena ligera = SEC ID NO: 36 ;) descritos en la presente anteriormente y residuos aminoácidos derivados de regiones variables de una inmunoglobulina humana. Los anticuerpos anti-CD40 humanizados incluyen opcionalmente sustituciones aminoácidas específicas en las regiones variables de línea germinal o de consenso.

[00160] La sustitución específica de los residuos aminoácidos en estas posiciones variables puede mejorar diversos aspectos del desempeño de los anticuerpos, incluyendo la afinidad de unión y/o estabilidad, sobre aquel demostrado en anticuerpos humanizados formados por "intercambio directo" de CDRs o HVLs en las regiones variables de línea germinal humana, como se muestra en los ejemplos a continuación.

[00161] En algunas realizaciones, la presente invención describe otros anticuerpos monoclonales con secuencias de cadena pesada (VH) de SEC ID NO: 1 a SEC ID NO: 4 y secuencias de cadena ligera (VL) secuencias de SEC ID NO: 5 a SEC ID NO: 8 (véanse las Tablas 1 y 2 más arriba). La secuencia CDR de estos anticuerpos murinos se muestran en las Tablas 3 y 4. Colocando así tales CDRs dentro de FRs de los dominios variables de cadena pesada y liviana de consenso humano, lo cual proporcionaría anticuerpos humanizados útiles del presente invento.

[00162] En algunas realizaciones específicas, los anticuerpos anti-CD40 humanizados divulgados en la presente comprenden por lo menos un dominio variable de cadena pesada o ligera que comprende las CDRs o HVLs de los anticuerpos monoclonales murinos, como se muestra en las Tablas 1 a 4 anteriores y las FRs de los dominios variables de cadena pesada y ligera de línea germinal humana. En realizaciones de ejemplo, los anticuerpos humanizados creados en la presente son: Anticuerpo A, Anticuerpo B, Anticuerpo C y las diferentes secuencias de cadena pesada y ligera de los mismos se muestran en SEC ID NO 26 a SEC ID NO: 40.

[00163] En realizaciones específicas, se contemplan anticuerpos que tienen una secuencia de cadena pesada de cualquiera de las SEC ID NO: 27, SEC ID NO: 28, SEC ID NO: 29 o SEC ID NO: 30 en combinación con una secuencia de cadena ligera de SEC ID NO : 26. Anticuerpos alternativos incluyen aquellos que tienen una secuencia de cadena pesada de la SEC ID NO: 32,

SEC ID NO: 33, SEC ID NO: 34 o SEC ID NO: 35, en combinación con una secuencia de cadena ligera de SEC ID NO: 31. En realizaciones aún adicionales, se proporcionan anticuerpos humanizados que tienen una secuencia de cadena pesada de la SEC ID NO: 37, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 39 o SEC ID NO: 40, en combinación con una secuencia de cadena ligera de la SEC ID NO: 36.

[00164] Las CDR de estas secuencias se muestran en las Tablas 3 y 4. En realizaciones específicas, se contempla que los anticuerpos quiméricos con regiones CDR cambiadas (es decir, por ejemplo cambiando una o dos CDRs del anticuerpo A por la CDR análoga del anticuerpo C) entre estas inmunoglobulinas de ejemplo pueden producir anticuerpos útiles.

[00165] En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 humanizado es un fragmento de anticuerpo. Diversos fragmentos de anticuerpos se han descrito anteriormente en general y hay técnicas que se han desarrollado para la producción de fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos pueden derivarse a través la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto, 1992, Journal of Biochemical and Biophysical Métodos 24:107-117; y Brennan, 1985, Science 229:81). Alternativamente, los fragmentos pueden producirse directamente en células hospederas recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de E. coli y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (véase, por ejemplo, Carter, 1992, Bio/Technology 10:163-167). Por otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente a partir de cultivo de células hospederas recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el médico experto.

[00166] Ciertas realizaciones incluyen un fragmento F(ab')₂ de un anticuerpo anti-CD40 humanizado que comprende una secuencia de cadena pesada de cualquiera de las SEC ID NO: 27, SEC ID NO: 28, SEC ID NO: 29 o SEC ID NO: 30 en combinación con una secuencia de cadena ligera de SEC ID NO: 26. Anticuerpos alternativos incluyen aquellos que tienen una secuencia de cadena pesada de la SEC ID NO: 32, SEC ID NO: 33, SEC ID NO: 34 o SEC ID NO: 35, en combinación con una secuencia de cadena ligera de SEC ID NO: 31. En realizaciones aún adicionales, se proporcionan anticuerpos humanizados que tienen una secuencia de cadena pesada de la SEC ID NO: 37, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 39 o SEC ID NO: 40, en

combinación con una secuencia de cadena ligera de la SEC ID NO: 36. Tales realizaciones pueden incluir un anticuerpo intacto que comprende dicho $F(ab')_2$.

[00167] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo incluye una región constante que media la función efectora. La región constante puede proporcionar respuestas de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) contra una célula diana que expresan CD40. Los dominios efectores pueden ser, por ejemplo, una región Fc de una molécula Ig. Típicamente, el agente de unión de CD40 recluta y/o activa glóbulos blancos citotóxicos (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), células fagocíticas (por ejemplo, macrófagos), y/o componentes séricos de complemento).

[00168] El dominio efector de un anticuerpo puede ser de cualquier especie animal vertebrada adecuada e isotipos. Los isotipos de distintas especies animales difieren en las capacidades para mediar las funciones efectoras. Por ejemplo, la capacidad de la inmunoglobulina humana para mediar CDC y ADCC/ ADCP es generalmente del orden de $IgM \approx IgG_1 \approx IgG_3 > IgG_2 > IgG_4$ y $IgG_1 \approx IgG_3 > IgG_2 / IgM / IgG_4$, respectivamente. Las inmunoglobulinas murinas median CDC y ADCC/ ADCP generalmente en el orden de $IgM \approx IgG_3 > IgG_{2b} > IgG_{2a} > IgG_1$ murino y $IgG_{2b} > IgG_{2a} > IgG_1 > IgG_3$, respectivamente. En otro ejemplo, IgG2a murino media ADCC mientras ambos IgG2a e IgM median CDC.

[00169] Modificaciones de Anticuerpos

[00170] Los anticuerpos anti-CD40 humanizados y los agentes pueden incluir modificaciones del anticuerpo anti-CD40 humanizado o fragmento de unión de antígenos del mismo. Por ejemplo, puede ser deseable modificar el anticuerpo con respecto a la función efectora, a fin de aumentar la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer. Una de estas modificaciones es la introducción de residuo de cisteína (s) en la región Fc, permitiendo así la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener capacidad mejorada de internalización y/o eliminación celular aumentada mediada por complemento y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Véase, por ejemplo, Caron, 1992, J. Exp. Med. 176:1191-1195, y Shopes, 1992, J. Immunol. 148:2918-2922. Los anticuerpos homodiméricos con mayor actividad antitumoral también se pueden preparar utilizando entrecruzadores heterobifuncionales tal como se describe en Wolff, 1993,

Cancer Research 53: 2560-2565. Alternativamente, un anticuerpo puede diseñarse para contener regiones Fc duales, mejorando la lisis del complemento y capacidades ADCC del anticuerpo.

Ver Stevenson, 1989, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230.

[00171] Los anticuerpos con capacidad mejorada para soportar ADCC se han generado mediante la modificación del patrón de glicosilación de su región Fc. Esto es posible ya que la glicosilación de anticuerpos en el residuo de asparagina, N297, en el dominio CH₂ está implicada en la interacción entre receptores IgG y Fcγ requisito para ADCC. Las líneas de celulares hospederas se han manipulado para expresar anticuerpos con glicosilación alterada, tales como N-acetilglucosamina de bisección aumentada o fucosa reducida. La reducción de fucosa proporciona mayor aumento a actividad de ADCC que aumentar la presencia de N-acetilglucosamina de bisección. Por otra parte, el aumento de ADCC por anticuerpos de baja fucosa es independiente del polimorfismo de FcγRIIIa V/F.

[00172] Modificar la secuencia de aminoácidos de la región Fc de los anticuerpos es una alternativa a la modificación de glicosilación para mejorar ADCC. El sitio de unión de IgG1 humana para receptores Fcγ ha sido determinado por análisis mutacional extenso. Esto condujo a la generación de anticuerpos IgG1 humanizados con mutaciones Fc que aumentan la afinidad de unión por FcγRIIIa y mejoran ADCC in vitro. Además, las variantes de Fc se han obtenido con muchas permutaciones diferentes de las propiedades de unión, por ejemplo, unión mejorada a los receptores de FcγR específicos con unión inalterada o disminuida a otros receptores de FcγR.

[00173] Otro aspecto incluye inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo humanizado o fragmentos del mismo conjugados con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

[00174] Agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados se han descrito anteriormente. Toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar para formar inmunoconjugados útiles incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos no fijadores de la toxina difteria, cadena A de la exotoxina (de la pseudomona aeruginosa), cadena A de la ricina, cadena A de la abrina, cadena A de la modeccina, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas de Fitolaca

americana (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de la Momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de la Sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, los tricotecenos y similares. Una variedad de radionucleidos están disponibles para la producción de anticuerpos anti-CD40 humanizados radioconjugados. Los ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re .

[00175] Los conjugados del anticuerpo anti-CD40 humanizado y agente citotóxico o quimioterapéutico, pueden prepararse por métodos conocidos, usando una variedad de agentes bifuncionales de acoplamiento de proteínas tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos bis-activos de flúor (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta, 1987, Science 238:1098. El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminapentaacético (MX-DTPA) rotulado con carbono 14 es un agente quelante de ejemplo para la conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Los conjugados también se pueden formar con un con un enlazador escindible.

[00176] En otra realización, el anticuerpo puede ser conjugado a un "receptor" (tal como estreptavidina) para su uso en un pre-ubicación de tumores.. En este procedimiento, el conjugado anticuerpo-receptor se administra a un paciente, seguido de la eliminación del conjugado no unido de la circulación usando un agente de depuración y luego la administración de un "ligando" que se une selectivamente al receptor (por ejemplo, avidina), el ligando siendo conjugado con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleido).

[00177] Los anticuerpos anti-CD40 humanizados divulgados en este documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 82:3688; Hwang, 1980, Proc.. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 77:4030, y las patentes de EE.UU. Nos. 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas que tienen mayor tiempo de circulación se describen, por ejemplo, en la patente EE.UU. No. 5.013.556.

[00178] Liposomas particularmente útiles pueden ser generados por el método de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada por PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' de un anticuerpo divulgado en la presente pueden ser conjugados con los liposomas como se describe en Martin, 1982, J. Biol. Chem. 257:286-288 mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico (tal como doxorubicina) está opcionalmente contenido dentro del liposoma. Véase, por ejemplo, Gabizon, 1989, J. National Cancer Inst. 81 (19): 1484.

[00179] Los anticuerpos descritos y revelados en la presente también se puede utilizar en procedimientos de ADEPT (Terapia Enzimático con Profármaco Dirigido por Anticuerpo) por conjugación del anticuerpo con una enzima activadora del profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptídico), en fármaco anti-cáncer activo. Véase, por ejemplo, los documentos WO 81/01145, WO 88/07378, y la Patente EE.UU. No. 4.975.278. El componente enzimático del inmunoconjugado útil para ADEPT es una enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal forma que convierte éste en su forma citotóxica más activa. Enzimas específicas que son útiles en ADEPT incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa para la conversión 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anti-cáncer, 5-fluorouracil; proteasas, tales como serratina proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, para convertir profármacos que contienen sustituyentes D-aminoácidos; enzimas de escisión de carbohidratos tales como β -galactosidasa y neuraminidasa para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; β -lactamasa para convertir fármacos derivatizados con β -lactamas en fármacos libres; y amidasas de penicilina, como la penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, los anticuerpos con actividad enzimática ("abzimas") se puede utilizar para convertir los profármacos en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, 1987, Nature 328: 457-458). Los conjugados anticuerpo-abzima se pueden preparar por métodos conocidos para la

administración de la abzyme a una población de células tumorales, por ejemplo, al unir de manera covalente la enzima al anticuerpo anti-CD40 humanizado/reactivos heterobifuncionales de entrecruzamiento descritos anteriormente. Alternativamente, las proteínas de fusión que comprenden al menos la región de unión del antígeno de un anticuerpo descrito en la presente unidas a al menos una porción funcionalmente activa de una enzima como se describió anteriormente se pueden construir utilizando técnicas de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Neuberger, 1984, Nature 312:604-608).

[00180] En ciertas realizaciones, puede ser deseable utilizar un fragmento de anticuerpo anti-CD40 humanizado, en lugar de un anticuerpo intacto, para aumentar la penetración del tumor, por ejemplo. Puede ser deseable modificar el fragmento de anticuerpo con el fin de incrementar su vida media en suero. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítipo de unión del receptor salvaje en el fragmento de anticuerpo. En un método, la región apropiada del fragmento de anticuerpo puede ser alterada (por ejemplo, mutada), o el epítipo puede ser incorporado en una etiqueta peptídica que luego se fusiona al fragmento de anticuerpo en cualquiera el extremo o el medio, por ejemplo, mediante ADN o síntesis de péptidos. Véase, por ejemplo, el documento WO 96/32478.

[00181] En otras realizaciones, las modificaciones covalentes del anticuerpo anti-CD40 humanizado también están incluidas. Las modificaciones covalentes incluyen la modificación de residuos de cisteinilo, restos de histidilo, residuos de lisinilo y amino-terminales, residuos de arginilo, residuos de tirosilo, grupos laterales de carboxilo (aspartilo o glutamilo), residuos de glutaminilo y asparaginilo, o residuos de serilo o treonilo. Otro tipo de modificación covalente implica acoplar química o enzimáticamente glicósidos al anticuerpo. Tales modificaciones pueden ser hechas por síntesis química o por escisión enzimática o química del anticuerpo, si es aplicable. Otros tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo se pueden introducir en la molécula haciendo reaccionar residuos aminoácidos específicos del anticuerpo con un agente de derivatización orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos amino-o carboxi-terminales.

[00182] La eliminación de cualquiera de las fracciones de carbohidrato presentes en el anticuerpo puede conseguirse química o enzimáticamente. La desglicosilación química se describe por Hakimuddin, 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y por Edge, 1981, Anal.

Biochem., 118:131. La escisión enzimática de las fracciones de carbohidratos en los anticuerpos puede lograrse mediante el uso de una variedad de endo-y exo-glicosidasas, tal como se describe por Thotakura, 1987, Meth. Enzymol 138:350.

[00183] Otro tipo de modificación covalente útil comprende unir el anticuerpo a uno de una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, o polioxialquilenos, en la forma establecida en una o más de las EE.UU.Pat. No. 4.640.835, EE.UU. Pat. N ° 4.496.689, EE.UU. Pat. N ° 4.301.144, EE.UU. Pat. N ° 4.670.417, EE.UU. Pat. N ° 4.791.192 y EE.UU. Pat. N ° 4.179.337.

[00184] Humanización y Variantes de Secuencias de Aminoácidos

[00185] Las variantes de secuencias aminoacídicas del anticuerpo anti-CD40 se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN del anticuerpo anti-CD40, o mediante síntesis de péptidos. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, residuos dentro de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-CD40 de los ejemplos en la presente. Cualquier combinación de deleciones, inserciones y sustituciones se realiza para llegar al constructo final, siempre que el constructo final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos post-traduccionales del anticuerpo anti-CD40 humanizado o variante, tales como cambiar el número o posición de los sitios de glicosilación.

[00186] Un método útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo anti-CD40 que son ubicaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina", como se describe por Cunningham y Wells (Science, 244:1081-1085 (1989)). Aquí, un residuo o grupo de residuos diana se identifican (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, his lys, y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutral o cargado negativamente (típicamente alanina) para afectar la interacción de los aminoácidos ácidos con el antígeno CD40. Aquellas ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan luego mediante la introducción de variantes adicionales u otras en, o para, los sitios de sustitución. Así, mientras que el sitio para introducir una variación de secuencia aminoacídica está predeterminado, la naturaleza de la mutación per se no necesita ser predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado,

el barrido de alanina o la mutagénesis aleatoria se realiza en el codón o región diana y las variantes de anticuerpos anti-CD40 se seleccionan para la actividad deseada.

[00187] Las inserciones de secuencias aminoácidas incluyen fusiones amino-y/o carboxi-terminales oscilan en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen un centenar o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de residuos aminoácidos únicos o múltiples. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo anti-CD40 fusionado a una etiqueta de epítipo. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo anti-CD40 incluyen una fusión con el extremo N-o C del anticuerpo anti-CD40 de una enzima o un polipéptido que aumenta la vida media en suero del anticuerpo.

[00188] Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo anti-CD40 eliminado y un residuo diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero las alteraciones FR también se contemplan. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 5, bajo el encabezado "sustituciones preferidas". Si tales sustituciones resultan en un cambio en la actividad biológica, entonces más cambios sustanciales, denominados "sustituciones de ejemplo", o como se describe a continuación en referencia a las clases de aminoácidos, se pueden introducir y se seleccionan los productos.

TABLA 5:

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

[00189] En la química de las proteínas, es generalmente aceptado que las propiedades biológicas del anticuerpo se pueden lograr mediante la selección de sustituciones que difieren

significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una lámina o conformación helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Residuos de origen natural se dividen en grupos basados en propiedades comunes de la cadena lateral:

[00190] (1) hidrofóbicos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[00191] (2) hidrofílicos neutrales: Cys, Ser, Thr;

[00192] (3) ácidos: asp, glu;

[00193] (4) alcalinos: asn, ginebra, his, lys, arg;

[00194] (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly pro, y

[00195] (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

[00196] Las sustituciones no conservadoras supondrán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

[00197] Cualquier residuo de cisteína no implicado en mantener la conformación adecuada del anticuerpo anti-CD40 humanizado o variante de también puede ser sustituido, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula, evitar entrecruzamiento aberrante, o proporcionar puntos establecidos de la conjugación a un compuesto citotóxico o citostático. A la inversa, los enlaces de cisteína se pueden añadir al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

[00198] Un tipo de variante de sustitución implica la sustitución de uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo precursor (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, las variantes resultantes seleccionadas para el desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas en relación con el anticuerpo precursor desde el cual se generan. Una manera conveniente para generar dichas variantes de sustitución es la maduración de afinidad utilizando las expresiones en fago. Brevemente, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpos así generadas se presentan en una forma monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto III génico de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes expresadas en fago son luego

clasificadas según su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión). Con el fin de identificar los sitios candidatos de regiones hipervariables para la modificación, la mutagénesis de barrido de alanina puede ser realizada para identificar residuos de regiones hipervariables que contribuyen significativamente a la unión de antígenos. Alternativamente, o además, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el CD40 humano. Tales residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas en la presente. Una vez que se generan esas variantes, el panel de variantes son sometidas a una clasificación (screening) como se describe en la presente y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes se pueden seleccionar para un mayor desarrollo.

[00199] Otro tipo de variante de aminoácidos del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. Por "alteración" se entiende la supresión de una o más fracciones de carbohidratos encontrados en el anticuerpo, y/o adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

[00200] En algunas realizaciones, puede ser deseable modificar los anticuerpos de la invención para añadir sitios de glicosilación. La glicosilación de anticuerpos es típicamente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión de la fracción de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la fracción de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación ligada a O se refiere a la fijación de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un ácido hidroxiamino, más comúnmente serina o treonina, aunque 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina también pueden ser utilizados. Por lo tanto, con el fin de glicosilar una proteína dada, por ejemplo, un anticuerpo, la secuencia de aminoácidos de la proteína es modificada para contener una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glicosilación N-ligados). La alteración también puede hacerse mediante la adición, o sustitución de uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación O ligados).

[00201] Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias aminoácidas del anticuerpo anti-CD40 se preparan mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento desde una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias aminoácidas de origen natural) o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis PCR y mutagénesis de casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo anti-CD40.

[00202] Polinucleótidos, Vectores, Células Hospederas y Métodos Recombinantes

[00203] Otras realizaciones abarcan polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia que codifica un anticuerpo anti-CD40 humanizado, vectores y células hospederas que comprenden los polinucleótidos, y técnicas recombinantes para la producción del anticuerpo humanizado. Los polinucleótidos aislados pueden codificar cualquier forma deseada del anticuerpo anti-CD40 incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa, Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena única, y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

[00204] Algunas realizaciones incluyen polinucleótidos aislados que comprenden secuencias que codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de cualquiera de las SEC ID N°: 1 a 4, SEC ID NO: 27, SEC ID NO: 28, SEC ID NO: 29, SEC ID NO: 30, SEC ID NO: 32, SEC ID NO: 33, SEC ID NO: 34, SEC ID NO: 35, SEC ID NO: 37, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 39, o SEC ID NO: 40. Algunas realizaciones incluyen polinucleótidos aislados que comprenden secuencias que codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera de la SEC ID NO: 26, SEC ID NO: 31, o SEC ID NO: 36.

[00205] En un aspecto, la secuencia polinucleótida aislada codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEC ID NO: 27 y SEC ID NO: 26, respectivamente; SEC ID NO: 28 y SEC ID NO: 26, respectivamente; SEC ID NO: 29 y SEC ID NO: 26, respectivamente; SEC ID NO: 30 y SEC ID NO: 26, respectivamente; SEC ID NO: 32 y SEC ID NO: 31, respectivamente; SEC ID NO: 33 y SEC ID NO: 31, respectivamente; SEC ID NO: 34 y SEC ID NO: 31, respectivamente; SEC ID NO: 35 y SEC ID

NO: 31, respectivamente; SEC ID NO : 37 y SEC ID NO: 36, respectivamente; SEC ID NO: 38 y SEC ID NO: 36, respectivamente; SEC ID NO: 39 y SEC ID NO: 36, respectivamente; SEC ID NO: 40 y SEC ID NO: 36, respectivamente.

[00206] El polinucleótido ó polinucleótidos que comprenden una secuencia que codifica un anticuerpo anti-CD40 humanizado o un fragmento o cadena del mismo puede ser fusionado a una o más secuencias reguladoras o de control, como se conoce en la técnica, y puede estar contenidos en vectores de expresión adecuados o célula hospedera como se conoce en la técnica. Cada una de las moléculas de polinucleótidos que codifican los dominios variables de cadena pesada o ligera que pueden ser independientemente fusionados a una secuencia polinucleótida que codifica un dominio constante, tal como un dominio constante humano, permitiendo la producción de anticuerpos intactos. Alternativamente, los polinucleótidos, o porciones de los mismos, se pueden fusionar juntos, proporcionando una plantilla para la producción de un anticuerpo de cadena única.

[00207] Para la producción recombinante, un polinucleótido que codifica el anticuerpo se inserta en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) O para la expresión. Muchos vectores adecuados para expresar el anticuerpo recombinante están disponibles. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento intensificador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción.

[00208] Los anticuerpos anti-CD40 humanizados también se pueden producir como polipéptidos de fusión, en los que se fusiona el anticuerpo con un polipéptido heterólogo, tal como una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo amino de la proteína madura o polipéptido. La secuencia señal heteróloga seleccionada es típicamente una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula hospedera. Para células huésped procariotas que no reconocen y procesan la secuencia señal de anticuerpos anti-CD40 humanizados, la secuencia señal puede ser sustituida por una secuencia señal procariota. La secuencia señal puede ser, por ejemplo, fosfatasa alcalina, penicilinas, lipoproteína, secuencias líder termoestables de enterotoxina II, y similares. Para secreción de levaduras, la secuencia señal nativa puede sustituirse, por ejemplo, con una secuencia líder de levadura obtenida a partir del factor alfa de la invertasa de levadura

(incluyendo secuencias líder del factor alfa de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), fosfatasa ácida, *C. albicans* glucoamilasa, o la señal descrita en WO90/13646. En células mamíferas, las secuencias señal mamíferas, así como secuencias líder secretorias virales, por ejemplo, la señal del herpes simplex gD, se puede utilizar. El ADN para dicha región precursora está ligado en marco de lectura al ADN que codifica el anticuerpo anti-CD40 humanizado.

[00209] Los vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicarse en una o más células hospederas seleccionadas. Generalmente, en vectores de clonación esta secuencia es una que permite al vector replicarse independientemente del ADN cromosómico del huésped, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Tales secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación desde el plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias Gram-negativas, el origen plásmido 2- μ es adecuado para levaduras, y varios orígenes virales (SV40, poliovirus, adenovirus, VSV, y BPV) son útiles para vectores de clonación en células mamíferas. Generalmente, el origen del componente de replicación no es necesario para los vectores de expresión mamíferos (el origen SV40 puede típicamente ser utilizado sólo porque contiene el promotor temprano).

[00210] Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen que codifica un marcador seleccionable para facilitar la identificación de la expresión. Típicos genes marcadores de selección codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, o alternativamente, son deficiencias auxotróficas de complemento, o en otras alternativas suministran nutrientes específicos que no están presentes en los medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para *Bacilli*.

[00211] Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que son transformadas exitosamente con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia al fármaco y por tanto sobreviven al régimen de selección. Ejemplos de dicha selección dominante utilizan los fármacos neomicina, ácido micofenólico, y la higromicina. Marcadores comunes seleccionables para células mamíferas son aquellos que permiten la identificación de células competentes para absorber un ácido nucleico que codifica un anticuerpo humanizado anti-CD40 anticuerpo, tal como DHFR

(dihidrofolato reductasa), timidina quinasa, metalotioneína-I y-II (por ejemplo, genes de la metalotioneína de primates), adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, y similares. Las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican primero cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula hospedera apropiada cuando DHFR de tipo silvestre se emplea es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad DHFR (por ejemplo, DG44).

[00212] Alternativamente, las células hospederas (particularmente huéspedes tipo silvestre que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican el anticuerpo anti-CD40, proteína DHFR tipo silvestre, y otro marcador seleccionable tal como aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (APH), se pueden seleccionar mediante crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. Véase, por ejemplo, patente de EE.UU.No. 4.965.199.

[00213] Donde la producción recombinante se realiza en una célula de levadura una célula hospedera, el gen TRP1 presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb, 1979, Nature 282: 39) puede ser utilizado como un marcador seleccionable. El gen TRP1 proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N ° 44076 o PEP4-1 (Jones, 1977, Genética 85:12). La presencia de la lesión trp1 en el genoma de célula hospedera de levadura proporciona entonces un entorno efectivo para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano. De manera similar, las células de levaduras deficientes de Leu2p, tales como ATCC 20.622 y 38.626 se complementan mediante plásmidos conocidos portadores del gen LEU2.

[00214] Además, los vectores derivados del plásmido circular pKD1 1.6 µm pueden usarse para la transformación de levaduras *Kluyveromyces*. Alternativamente, un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternero recombinante se reportó para *K. lactis* (Van den Berg, 1990, Bio/Technology 8:135). Vectores de expresión multi-copia adecuados para la secreción de albúmina madura de suero humano recombinante por cepas industriales de *Kluyveromyces* también se ha divulgado (Fleer, 1991, Bio/Technology 9:968-975).

[00215] Los vectores de expresión y clonación contienen generalmente un promotor que es reconocido por el organismo hospedero y está unido operativamente a la molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-CD40 o cadena polipeptídica del mismo. Los promotores adecuados para uso con huéspedes procariotas incluyen el promotor phoA, la β -lactamasa y los sistemas promotores de lactosa, fosfatasa alcalina, sistema promotor de triptófano (trp), y promotores híbridos tal como el promotor tac. Otros promotores bacterianos conocidos también son adecuados. Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (SD) unida operativamente al ADN que codifica el anticuerpo anti-CD40 humanizado.

[00216] Se conocen muchas secuencias de promotores eucarióticos. Virtualmente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción. Otra secuencia hallada 70 a 80 bases corriente arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificadora. Todas estas secuencias se insertan de forma adecuada en vectores de expresión eucariotas.

[00217] Ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con huéspedes de levadura incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3 - fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafofosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

[00218] Los promotores inducibles tienen la ventaja adicional de transcripción controlada por las condiciones de crecimiento. Estos incluyen las regiones promotoras de levadura para alcohol deshidrogenasa-2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas derivadas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Vectores y promotores adecuados para uso en expresión de levaduras se describen adicionalmente en EP 73.657. Los potenciadores de levadura también se utilizan ventajosamente con promotores de levadura.

[00219] La transcripción de anticuerpos anti-CD40 humanizados desde vectores en células hospederas mamíferas se controla, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus del poliovirus, el virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y el Virus Simiano 40 (SV40), de promotores mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de la actina o un promotor de inmunoglobulina, o de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospederas.

[00220] Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresar ADN en huéspedes mamíferos utilizando el virus del papiloma bovino como un vector se describe en la patente de EE.UU. N ° 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente EE.UU. N ° 4.601.978. Véase también Reyes, 1982, Nature 297:598-601, que divulga la expresión de ADNc de p-interferón humano en células murinas bajo el control de un promotor de timidina quinasa desde el virus del herpes simple. Alternativamente, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous puede ser utilizada como el promotor.

[00221] Otro elemento útil que se puede utilizar en un vector de expresión recombinante es una secuencia potenciadora, que se utiliza para aumentar la transcripción de un ADN que codifica un anticuerpo anti-CD40 humanizado por eucariotas superiores. Muchas secuencias potenciadoras (*enhancer*) son ahora conocidas de genes de mamíferos (por ejemplo, globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Típicamente, sin embargo, se utiliza un potenciador a partir de un virus de célula eucariótica. Ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador de poliovirus sobre costado tardío del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. Ver también Yaniv, 1982, Nature 297:17-18 para una descripción de los elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El intensificador puede empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' a la secuencia codificadora del anticuerpo anti-CD40 humanizado, pero se localiza preferiblemente en un sitio 5' desde el promotor.

[00222] Los vectores de expresión utilizados en células hospederas eucariotas (células de levaduras, micóticas, de insecto, vegetales, animales, humanas o nucleadas desde otros organismos multicelulares) también pueden contener secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están disponibles comúnmente de las regiones no traducidas 5', y ocasionalmente 3', de ADN's ó ADN's eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo anti-CD40. Un componente útil de terminación de transcripción es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino. Ver WO94/11026 y el vector de expresión descrito en la misma. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD40 humanizados pueden expresarse usando el sistema CHEF. (Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.888.809; la divulgación de la misma se incorpora en la presente como referencia.)

[00223] Las células hospederas adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores en la presente son las células procariotas, de levaduras o células eucariotas superiores descritas anteriormente. Las procariotas adecuadas para este propósito incluyen las eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, las enterobacterias como la *Escherichia*, por ejemplo la *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens*, y *Shigella*, así como Bacilli tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41 P descrita en DD 266.710, publicada el 12 de abril 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un huésped de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque otras cepas como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos más que limitantes.

[00224] Además de las procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos anti-CD40 humanizados. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura común de panadería, es la más comúnmente utilizada entre los microorganismos hospederos eucariotas inferiores. Sin embargo, un número de otros géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles en la presente, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae*

(ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastors* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*, y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, huéspedes de *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

[00225] Las células hospederas adecuadas para la expresión de anticuerpo anti-CD40 humanizado glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos, incluyendo, por ejemplo, numerosas cepas y variantes de baculovirus y las correspondientes células hospederas permisivas de insectos de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca del vinagre), y *Bombyx mori* (gusano de seda). Una variedad de cepas virales para la transfección están disponibles públicamente, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y tales virus pueden ser utilizados, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

[00226] Cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco también pueden utilizarse como huéspedes.

[00227] En otro aspecto, la expresión de anti-CD40 humanizado se lleva a cabo en células de vertebrados. La propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario y las técnicas están ampliamente disponibles. Ejemplos líneas celulares huésped de mamíferos son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), la línea de riñón embrionario humano (293 o 293 células subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, (Graham, 1977, J. Gen Virol 36:59), células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10), células de ovario de hámster chino /-DHFR1 (CHO, Urlaub, 1980, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 77: 4216; por ejemplo, DG44), células sertoli de ratón (TM4, Mather, 1980, Biol. Reprod. 23:243-251), células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70), células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587), células humanas de carcinoma cervical (HELA, ATCC CCL 2), células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34), células de hígado de rata bufalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442), células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75), células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065), tumor

mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51), células TR1 (Mather, 1982, Annals NY Acad Sci 383: 44-68), células MRC 5, células FS4, y la línea de hepatoma humano (Hep G2).

[00228] Las células hospederas se transforman con los vectores de expresión o clonación antes descritos para producción de anticuerpos anti-CD40 humanizados y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

[00229] Las células hospederas utilizadas para producir un anticuerpo humanizado anti-CD40 descrito en el presente documento pueden cultivarse en una variedad de medios. Medios disponibles comercialmente tales como el F10 de Ham (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Misuri), Medio Mínimo Esencial ((MEM), (Sigma-Aldrich Co.), RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Co.), y Medio Eagle Modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma-Aldrich Co.) son adecuados para cultivar la células hospederas. Además, cualquiera de los medios descritos en una o más de Ham, 1979, Meth Enz 58: 44, Barnes, 1980, Anal. Biochem 102: 255, EE.UU. Pat. N ° 4.767.704, EE.UU. Pat. N ° 4.657.866, EE.UU. Pat. N ° 4.927.762, EE.UU. Pat. N ° 4.560.655, EE.UU. Pat. No. 5,122,469, WO 90/103430, y WO 87/00195 se puede utilizar como medio de cultivo para las células hospederas. Cualquiera de estos medios podría suplementarse según sea necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), buffers (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como gentamicina), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos usualmente presentes en concentraciones finales en el rango micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Otros suplementos pueden incluirse también en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son aquellas utilizadas previamente con la célula hospedera seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la materia.

[00230] Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, las células pueden ser interrumpidas para liberar la proteína como un primer paso. Los desechos particulados, bien sea células huésped o fragmentos lisados, pueden removerse, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter, 1992,

Bio/Technology 10:163-167 describe un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, la pasta celular se descongela en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 minutos. Los desechos celulares se pueden eliminar por centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión generalmente se concentran en primer lugar utilizando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Un inhibidor de proteasa tal como PMSF puede incluirse en cualquiera de los pasos anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios. Una variedad de métodos se puede utilizar para aislar el anticuerpo de la célula hospedera.

[00231] La composición de anticuerpo preparada a partir de las células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, con cromatografía de afinidad como una técnica de purificación típica. La idoneidad de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. La proteína A se puede utilizar para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$, o $\gamma 4$ (véase, por ejemplo, Lindmark, 1983 J. Immunol. Meth. 62:1-13). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humano (véase, por ejemplo, Guss, 1986 EMBO J. 5:1567-1575). Una matriz a la que se une un ligando de afinidad es a menudo la agarosa, pero hay otras matrices disponibles. Matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli (estirenodivinil) benceno permiten velocidades de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que se pueden lograr con la agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_{H3} , la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina Sepharose™ cromatografía sobre una resina de intercambio catiónico o aniónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía, SDS-PAGE, y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo a recuperar.

[00232] Después de cualquier etapa de purificación preliminar (s), la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrofóbica a pH bajo utilizando un buffer de elución a un pH entre aproximadamente 2.5 a 4.5, típicamente realizada a bajas concentraciones de sal (por ejemplo, desde aproximadamente 0-0.25 M de sal).

[00233] También se incluyen ácidos nucleicos que se hibridizan bajo condiciones bajas, moderadas y altas de respuesta estricta, tal como se define en la presente, a todo o una porción (por ejemplo, la porción que codifica la región variable) de la secuencia de nucleótidos representada por la secuencia aislada de polinucleótido (s) que codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEC ID NO: 27 y SEC ID NO: 26, respectivamente; SEC ID NO: 28 y SEC ID NO: 26, respectivamente; SEC ID NO: 29 y SEC ID NO: 26, respectivamente; SEC ID NO: 30 y SEC ID NO: 26, respectivamente; SEC ID NO: 32 y SEC ID NO: 31, respectivamente; SEC ID NO: 33 y SEC ID NO: 31, respectivamente; SEC ID NO: 34 y SEC ID NO: 31, respectivamente; SEC ID NO: 35 y SEC ID NO: 31, respectivamente; SEC ID NO: 37 y SEC ID NO: 36, respectivamente; SEC ID NO: 38 y SEC ID NO: 36, respectivamente; SEC ID NO: 39 y SEC ID NO: 36, respectivamente; SEC ID NO: 40 y SEC ID NO: 36, respectivamente. La parte de hibridación del ácido nucleico bajo hibridación tiene típicamente al menos 15 (por ejemplo, 20, 25, 30 ó 50) nucleótidos de longitud. La parte de hibridación del ácido nucleico bajo hibridación es de al menos 80%, por ejemplo, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 98%, idéntica a la secuencia de una porción o la totalidad de un ácido nucleico que codifica un polipéptido anti-CD40 (por ejemplo, una región variable de cadena pesada o de cadena ligera), o su complemento. Los ácidos nucleicos bajo hibridación del tipo descrito en la presente se puede utilizar, por ejemplo, como una sonda de clonación, un cebador, por ejemplo, un cebador PCR, o una sonda de diagnóstico.

[00234] Algunas realizaciones incluyen polinucleótidos aislados que incluyen secuencias que codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada que es al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEC ID NO: 1 a 4, SEC ID NO: 27, SEC ID NO: 28, SEC ID NO: 29, SEC ID NO: 30, SEC ID NO: 32, SEC ID NO: 33, SEC ID NO: 34, SEC ID NO: 35, SEC ID NO: 37, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 39, o

SEC ID NO: 40. Algunas realizaciones incluyen polinucleótidos aislados que incluyen secuencias que codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera que es al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEC ID NO: 5 a 8, SEC ID NO: 26, SEC ID NO: 31, o SEC ID NO: 36.

[00235] En un aspecto, la secuencia aislada de polinucleótido (s) codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, incluyendo cada uno una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEC ID NO: 27 y SEC ID NO: 26, respectivamente; SEC ID NO: 28 y SEC ID NO: 26, respectivamente; SEC ID NO: 29 y SEC ID NO: 26, respectivamente; SEC ID NO: 30 y SEC ID NO: 26, respectivamente; SEC ID NO: 32 y SEC ID NO: 31, respectivamente; SEC ID NO: 33 y SEC ID NO: 31, respectivamente; SEC ID NO: 34 y SEC ID NO: 31, respectivamente; SEC ID NO: 35 y SEC ID NO : 31, respectivamente; SEC ID NO: 37 y SEC ID NO: 36, respectivamente; SEC ID NO: 38 y SEC ID NO: 36, respectivamente; SEC ID NO: 39 y SEC ID NO: 36, respectivamente SEC ID NO: 40 y SEC ID NO: 36, respectivamente.

[00236] Como se utilizan en la presente, los términos "idéntico" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o de residuos aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima. Para determinar el porcentaje de identidad, las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse brechas (gaps) en la secuencia de un primer aminoácido o secuencia de ácidos nucleicos para alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos). Los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las correspondientes posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos se comparan luego. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es

decir, % de identidad = No. de posiciones idénticas/No. total de posiciones (por ejemplo, posiciones superpuestas)x100). En algunas realizaciones, las dos secuencias que se comparan tienen la misma longitud después de introducir las brechas dentro de las secuencias, según sea apropiado (por ejemplo, excluyendo secuencia adicional que se extiende más allá de las secuencias que se comparan). Por ejemplo, cuando las secuencias de región variable se comparan, las secuencias de dominio líder constante no se consideran. Para las comparaciones de secuencia entre dos secuencias, una CDR "correspondiente" se refiere a una CDR en el mismo lugar en ambas secuencias (por ejemplo, CDR-H1 de cada secuencia).

[00237] La determinación del porcentaje de identidad o porcentaje de similitud entre dos secuencias puede realizarse utilizando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido, un ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90:5873-5877. Dicho algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul, 1990, J. Mol. Biol.. 215:403-410. Búsquedas de nucleótidos BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias aminoácidas homólogas a una proteína de interés. Búsquedas de proteínas BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a la proteína de interés. Para obtener alineaciones con brechas para propósitos de comparación, Gapped BLAST se puede utilizar como se describe en Altschul, 1997, Nucleic Acids Res.. 25:3389-3402. Alternativamente, PSI-Blast se puede utilizar para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas (Id.). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST, y PSI-BLAST, se pueden utilizar los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Otro ejemplo preferido no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). Dicho algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2,0) que es parte del paquete de software de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de brecha de 12 y una penalización por brecha de 4 se pueden utilizar. Algoritmos adicionales para el análisis de secuencia son conocidos en la técnica e incluyen ADVANCE y ADAM como se

describe en Torellis y Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10:3-5, y FASTA descrito en Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85:2444-8. Dentro de FASTA, ktup es una opción de control que establece la sensibilidad y velocidad de la búsqueda. Si ktup = 2, regiones similares en las dos secuencias que se comparan se encuentran al ver los pares de residuos alineados; si ktup = 1, aminoácidos alineados individuales se examinan. ktup se puede ajustar a 2 ó 1 para secuencias de proteínas, o de 1 a 6 para secuencias de ADN. El valor por defecto si no se especifica ktup es 2 para proteínas y 6 para ADN. Alternativamente, la alineación de secuencias de proteínas se puede llevar a cabo utilizando el algoritmo CLUSTAL W, tal como se describe por Higgins, 1996, Methods Enzymol. 266:383-402.

[00238] Usos no terapéuticos

[00239] Los anticuerpos descritos en la presente son útiles como agentes de purificación de afinidad. En este proceso, los anticuerpos se inmovilizan en una fase sólida tal como una resina de la Proteína A, usando métodos bien conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene la proteína CD40 (o fragmento de la misma) a purificar, y luego se lava el soporte con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra excepto la proteína CD40, que está unida al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado que liberará la proteína CD40 desde el anticuerpo.

[00240] Los anticuerpos anti-CD40 humanizados también son útiles en ensayos de diagnóstico para detectar y/o cuantificar la proteína CD40, por ejemplo, detectando expresión de CD40 en células específicas, tejidos o suero.

[00241] Será ventajoso en algunas realizaciones, por ejemplo, para fines de diagnóstico etiquetar el anticuerpo con una fracción detectable. Numerosas etiquetas detectables están disponibles, incluyendo radioisótopos, etiquetas fluorescentes, etiquetas de sustratos enzimáticos y similares. El marcador puede conjugarse indirectamente con el anticuerpo utilizando diversas técnicas conocidas. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina y cualquiera de las tres categorías amplias de etiquetas mencionadas anteriormente puede conjugarse con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a la avidina y por lo tanto, la etiqueta puede conjugarse con el anticuerpo de esta manera indirecta. Alternativamente, para conseguir la conjugación indirecta de la etiqueta con el anticuerpo, el anticuerpo puede conjugarse con un

pequeño hapteno (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de etiquetas mencionadas anteriormente se conjuga con un anticuerpo anti-hapteno (por ejemplo, anticuerpo anti-digoxina). Por lo tanto, se puede lograr la conjugación indirecta de la etiqueta con el anticuerpo.

[00242] Ejemplos de etiquetas de radioisótopos incluyen ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , y ^{131}I . El anticuerpo puede marcarse con el radioisótopo, utilizando las técnicas descritas en, por ejemplo, *Current Protocols in Immunology*, Volúmenes 1 y 2, 1991, Coligen, Ed. Wiley-Interscience, Nueva York, N.Y., Pubs. La radiactividad puede medirse, por ejemplo, mediante recuento de centelleo.

[00243] Ejemplos de etiquetas fluorescentes incluyen etiquetas derivadas de quelatos de tierras raras (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, lisamina, ficoeritrina, y el rojo Texas están disponibles. Las etiquetas fluorescentes pueden conjugarse con el anticuerpo mediante técnicas conocidas, tales como los descritos en *Current Protocols in Immunology*, arriba, por ejemplo. La fluorescencia puede cuantificarse usando un fluorímetro.

[00244] Hay varias etiquetas de sustrato de enzima bien caracterizadas conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, EE.UU. Pat. No. 4.275.149 para una revisión). La enzima generalmente cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que puede medirse usando diversas técnicas. Por ejemplo, la alteración puede ser un cambio de color en un sustrato que puede medirse de manera espectrofotométrica. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia se han descrito anteriormente. El sustrato quimioluminiscente se vuelve electrónicamente excitado mediante una reacción química y entonces puede emitir luz que se puede medir, utilizando un quimioluminómetro, por ejemplo, o dona energía a un aceptor fluorescente.

[00245] Ejemplos de etiquetas enzimáticas incluyen luciferasas tales como luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (EE.UU. Pat. No. 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacárido (tales como glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa, y

similares. Las técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos se describen, por ejemplo, en O'Sullivan, 1981, *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, in *Methods in Enzym.* (J. Langone & H. Van Vunakis, eds), Academic Press, Nueva York, 73: 147-166.

[00246] Ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato incluyen, por ejemplo: peroxidasa de rábano picante (HRPO) con peroxidasa de hidrógeno como un sustrato, en donde la peroxidasa de hidrógeno oxida un precursor de colorante tal como ortofenilendiamina (OPD) o hidrocloreuro de bencidina de 3,3',5,5'-tetrametilo (TMB); fosfatasa alcalina (AP) con para-nitrofenil fosfato como sustrato cromogénico; y β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico tal como p-nitrofenil- β -D-galactosidasa o sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil - β -D-galactosidasa.

[00247] Otras combinaciones enzima-sustrato numerosas se encuentran disponibles para los expertos en la técnica. Para una revisión general de éstos, véase la EE.UU. Pat. No. 4.275.149 y EE.UU. Pat. No. 4.318.980.

[00248] En otra realización, el anticuerpo anti-CD40 humanizado se utiliza sin etiquetar y se detectó con un anticuerpo etiquetado que se une al anticuerpo anti-CD40 humanizado.

[00249] Los anticuerpos descritos en la presente se pueden emplear en cualquier procedimiento de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos tipo sándwich directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación. Véase, por ejemplo, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, páginas 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

[00250] Kits de diagnóstico

[00251] Un anticuerpo anti-CD40 humanizado puede utilizarse en un kit de diagnóstico, es decir, una combinación empaquetada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar el ensayo de diagnóstico. Cuando el anticuerpo está etiquetado con una enzima, el kit puede incluir sustratos y cofactores requeridos por la enzima tal como un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable. Además, otros aditivos se pueden incluir tales como estabilizantes, tampones (por ejemplo, un tampón de bloqueo o tampón de lisis), y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variarse ampliamente para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que

optimicen sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Los reactivos pueden proporcionarse como polvos secos, generalmente liofilizados, incluyendo excipientes que en disolución proporcionarán una solución de reactivo que tiene la concentración apropiada.

[00252] Usos Terapéuticos

[00253] En otra realización, un anticuerpo anti-CD40 humanizado descrito en la presente es útil en el tratamiento de diversos trastornos asociados con la expresión de CD40 como se describe en la presente.

[00254] El anticuerpo anti-CD40 humanizado o el agente se administra por cualquier medio adecuado, incluyendo parenteral, subcutáneo, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para el tratamiento inmunosupresor local, administración intralesional (incluyendo perfusión o de otro modo contacto del injerto con el anticuerpo antes del trasplante). El anticuerpo anti-CD40 humanizado o el agente se puede administrar, por ejemplo, como una infusión o como un bolo. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el anticuerpo anti-CD40 humanizado se administra adecuadamente mediante infusión de pulsos, particularmente con dosis decrecientes de anticuerpo. En un aspecto, la dosificación se administra mediante inyecciones, más preferiblemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

[00255] Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de anticuerpo dependerá de una variedad de factores tales como el tipo de enfermedad a tratar, como se define anteriormente, la gravedad y curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para fines terapéuticos o preventivos, terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico tratante. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente una vez o durante una serie de tratamientos.

[00256] Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a 20 mg/kg (por ejemplo, 0.1-15 mg/kg) de anticuerpo es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, sea, por ejemplo, por una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica podría oscilar desde aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el

tratamiento se mantiene hasta la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales. Un régimen de dosificación ejemplar es el descrito en el documento WO 94/04188.

[00257] El término "supresión" se utiliza aquí en el mismo contexto como "mejoría" y "alivio" en el sentido de una disminución de una o más características de la enfermedad.

[00258] La composición de anticuerpo se formulará, dosificará y administrará de forma consistente con la buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular a tratar, el mamífero particular a tratar, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, la programación de la administración, y otros factores conocidos por los médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del anticuerpo a administrar se regirá por tales consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar, o tratar el trastorno asociado con la expresión de CD40.

[00259] El anticuerpo no necesita ser, pero es opcionalmente, formulado con uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo anti-CD40 humanizado presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores discutidos anteriormente. Éstos se utilizan generalmente en las mismas dosis y con vías de administración como se usan aquí anteriormente o aproximadamente 1 a 99% de las dosificaciones empleadas hasta ahora.

[00260] Trastornos Asociados a CD40

[00261] Los anticuerpos o agentes anti-CD40 son útiles para tratar o prevenir un cáncer que expresa CD40 o un trastorno inmunológico caracterizado por la expresión de CD40, por ejemplo, mediante la activación inapropiada de células inmunes (por ejemplo, linfocitos o células dendríticas). Tal expresión de CD40 puede ser debida, por ejemplo, al aumento de los niveles de proteína CD40 en la superficie de las células y/o antigenicidad alterada de la CD40 expresada. Tratamiento o prevención del trastorno inmunológico, según los métodos descritos en la presente, se logra mediante la administración a un sujeto en necesidad de tal tratamiento o prevención de una cantidad eficaz del anticuerpo anti-CD40 o agente, por el que el anticuerpo (i) se une a células inmunes activadas que expresan CD40 y que están asociadas con el estado de la

enfermedad y (ii) ejercen un efecto citotóxico, citostático o inmunosupresivo sobre las células inmunitarias activadas.

[00262] Enfermedades inmunológicas que se caracterizan por la activación inapropiada de células inmunes y que se pueden tratar o prevenir mediante los métodos descritos en la presente se pueden clasificar, por ejemplo, por el tipo(s) de reacción(es) de hipersensibilidad que subyacen a la enfermedad. Estas reacciones se clasifican típicamente en cuatro tipos: reacciones anafilácticas, reacciones citotóxicas (citolíticas), reacciones de complejo inmunitario, o reacciones de inmunidad mediada por células (CMI) (también conocida como reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH)). (Véase, por ejemplo, *Fundamental Immunology* (William E. Paul ed., RavenPress, Nueva York, 3ª ed., 1993).)

[00263] Ejemplos específicos de tales enfermedades inmunológicas incluyen los siguientes: artritis reumatoide, enfermedades autoinmunes desmielinizantes (por ejemplo, esclerosis múltiple, encefalomiелitis alérgica), oftalmopatía endocrina, uveorretinitis, lupuseritematoso sistémico, miastenia gravis, enfermedad de Grave, glomerulonefritis, trastorno hepatológico autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa), anafilaxis, reacción alérgica, síndrome de Sjogren, diabetes mellitus tipo I, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, fibromialgia, polimiositis, dermatomiositis, miositis inflamatoria, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, uveítis autoinmune, enfermedad de Addison, adrenalitis, tiroiditis, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad tiroidea autoinmune, anemia perniciosa, atrofia gástrica, hepatitis crónica, hepatitis lupoide, aterosclerosis, lupus eritematoso cutáneo subagudo, hipoparatiroidismo, síndrome de Dressler, trombocitopenia autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica, pénfigo vulgar, pénfigo, dermatitis herpetiforme, alopecia arcata, penfigoide, esclerodermia, esclerosis sistémica progresiva, síndrome CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), la infertilidad autoinmune masculina y femenina, espondilitis anquilosante, colitis ulcerosa, enfermedad mixta del tejido conectivo, poliarteritisnecrotizante, vasculitis necrotizante sistémica, dermatitis atópica, rinitis atópica, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Chagas, sarcoidosis, fiebre reumática, asma, aborto recurrente, síndrome antifosfolípido, pulmón de granjero, eritema multiforme, síndrome post cardiotomía, síndrome de Cushing, hepatitis crónica activaautoinmune, pulmón del cuidador de palomas (neumonitis por hipersensibilidad), necrólisis epidérmica tóxica, síndrome de Alport, alveolitis,

alveolitis alérgica, alveolitis fibrosante, enfermedad pulmonar intersticial, eritema nodoso, pioderma gangrenoso, reacción a transfusión, arteritis de Takayasu, polimialgia reumática, arteritis temporal, esquistosomiasis, arteritis de células gigante, ascariasis, aspergilosis, síndrome Sampter, eczema, granulomatosis linfomatoide, enfermedad de Behcet, síndrome de Caplan, enfermedad de Kawasaki, dengue, encefalomielitis, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, endoftalmitis, eritema elevatum et diutinum, psoriasis, eritroblastosis fetal, fascitiseosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, filariasis, ciclitis, ciclitiscrónica, ciclitisheterocrónica, ciclitis de Fuch, nefropatía por IgA, púrpura de Henoch-Schonlein, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de trasplante, cardiomiopatía, síndrome de Eaton-Lambert, policondritis recidivante, crioglobulinemia, macroglobulemia de Waldenstrom, síndrome de Evan, síndrome de dificultad respiratoria aguda, inflamación pulmonar, osteoporosis, hipersensibilidad de tipo retardado e insuficiencia gonadal autoinmune.

[00264] En consecuencia, los métodos descritos en la presente abarcan el tratamiento de trastornos de linfocitos B (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, artritis reumatoide y diabetes tipo I), linfocitos Th₁ (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, síndrome de Sjorgren, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, tuberculosis, o enfermedad de injerto contra huésped) o linfocitos Th₂ (por ejemplo, dermatitis atópica, lupus eritematoso sistémico, asma atópica, rinoconjuntivitis, rinitis alérgica, síndrome de Omenn, esclerosis sistémica, o enfermedad crónica de injerto contra huésped). Generalmente, los trastornos que implican células dendríticas implican trastornos de linfocitos Th₁ o Th₂.

[00265] La artritis reumatoide (AR) es una de las enfermedades inflamatorias autoinmunes más comunes que afectan a aproximadamente el 1% de la población. Mientras que los tratamientos eficaces (por ejemplo, MTX y los agentes anti-TNF) están disponibles, existe una gran necesidad médica no satisfecha, especialmente para aquellos pacientes que no responden adecuadamente a las terapias anti-TNF (aproximadamente 30% de los pacientes). Además, hasta el 50% de los pacientes interrumpen el tratamiento antagonista de TNF en el plazo de 5 años, principalmente debido a eventos adversos, pero también porque un número cada vez más reconocido de pacientes pierden beneficio terapéutico. Por lo tanto, es importante establecer terapias eficaces que actúen sobre la inflamación y destrucción articular en AR, pero no que se basen únicamente en la inhibición directa de TNF. Un enfoque muy atractivo es el de

abordar las vías celulares coestimuladoras. Uno de los principales pares receptor-ligando en la coestimulación es CD40/CD40L. Este sistema permite que las interacciones entre las células inmunes, y entre las células inmunes y no inmunes, las cuales son importantes en la patogénesis de la AR. El bloqueo de CD40 con un anticuerpo antagonista de la presente invención pueden tener uno o más de los siguientes efectos en la AR:

[00266] 1) Inhibición de la diferenciación de linfocitos B y el cambio de isotipo de anticuerpo;

[00267] 2) Inhibición de la producción de citoquinas y quimioquinas y la regulación positiva de las moléculas de adhesión en células T y macrófagos;

[00268] 3) Inhibición de la activación de células dendríticas y

[00269] 4) Inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, metaloproteinasas de la matriz, prostaglandinas, y regulación negativa de moléculas de adhesión en células no inmunes (por ejemplo, células epiteliales, endoteliales y mesenquimales).

[00270] Los métodos para lograr uno o más de los efectos anteriores se contemplan expresamente en la presente. Además de la AR, las composiciones de la presente invención serán particularmente útiles en métodos de tratamiento de esclerosis múltiple, psoriasis (incluyendo artritis psoriásica), artritis reumatoide juvenil. Enfermedad inflamatoria intestinal, lupus eritematoso sistémico, y el trasplante de órganos sólidos.

[00271] La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica, autoinmune sistémica con una prevalencia de aproximadamente el 1% en los adultos. La enfermedad sigue siendo causa de morbilidad y mortalidad prematura (mortalidad se debe principalmente a la enfermedad cardiovascular acelerada). Ahora se ha identificado que el daño articular se produce muy temprano en el curso de la enfermedad con hasta 30% de los pacientes que muestran evidencia radiográfica de erosiones óseas en el momento del diagnóstico, aumentando a 60% después de 1 año. Las guías actuales recomiendan iniciar el tratamiento con medicamentos antirreumáticos modificadores de enfermedad tradicionales (MARME) en los 3 meses después de que un diagnóstico definitivo se ha establecido. MARMEs tienen el potencial de reducir o prevenir el daño articular y preservar la función articular. En la actualidad, los reumatólogos seleccionan metotrexato (MTX) como el tratamiento con MARME inicial para la mayoría de los pacientes.

[00272] Los antagonistas de TNF etanercept (Enbrel ®), infliximab (Remicade ®), adalimumab (Humira ®), el antagonista de CTLA4 abatacept (Orencia ®), mAb del receptor de anti-IL-6 tocilizumab y el mAb anti-CD20 rituximab (Rituximab ®) son eficaces en el tratamiento de la AR. Las guías actuales recomiendan el uso de MARMES biológicos para el tratamiento de la AR activa después de una respuesta insuficiente a MARMES tradicionales.

[00273] Estudios recientes realizados en pacientes con AR agresivo precoz sin previo tratamiento de MTX mostraron que la combinación de MTX con un antagonista de TNF fue superior a cada uno cuando se utilizaban como monoterapia. El resultado más sorprendente fue el beneficio radiológico significativo de la terapia de combinación. Así, la combinación de MTX e inhibidores de TNF debe ser utilizada en pacientes con mayor riesgo de enfermedad agresiva y fenotipo agresivo (por ejemplo, puntuación de actividad alta, deterioro funcional, seropositividad para el factor reumatoide (RF) o anticuerpo de péptido citrulinado anti-cíclico (CCP), PCR elevada, erosiones radiográficas). Sin embargo, podemos anticipar que en la práctica clínica será raro que los antagonistas TNF se utilicen como terapia de primera línea. Una encuesta de reumatólogos de EE.UU. realizadas en abril de 2005 mostró que los factores que más influyen en la decisión de utilizar un antagonista de TNF fueron: insuficiencia de MTX o múltiples MARMES, la evaluación global del médico, deterioro funcional y empeoramiento radiológico o erosiones. En la actualidad, se estima que el 20% de los pacientes con AR reciben tratamiento con inhibidor de TNF en EE.UU.

[00274] Un porcentaje sustancial de pacientes con AR no son ayudados adecuadamente con los tratamientos actuales incluyendo tratamientos biológicos, ya sea a causa de la intolerancia al fármaco y la toxicidad o la falta de respuesta. Hasta 50% de los pacientes interrumpen el tratamiento de antagonista de TNF dentro de 5 años, principalmente debido a eventos adversos, pero también porque un número cada vez más reconocido de los pacientes pierden su respuesta.

[00275] En algunas realizaciones, el trastorno inmunológico es un trastorno inmunológico mediado por células T, tal como un trastorno de las células T en la que las células T activadas asociadas con el trastorno expresan CD40. Los anticuerpos anti-CD40 o agentes pueden administrarse para agotar tales células T activadas que expresen CD40. En una realización específica, la administración de anticuerpos anti-CD40 o agentes pueden agotar

células T activadas que expresan CD40, mientras que las células T en reposo no son agotadas sustancialmente por el anti-CD40 o agente. En este contexto, "no sustancialmente agotado" significa que menos de aproximadamente 60%, o menos de aproximadamente 70% o menos de aproximadamente 80% de las células T en reposo no se agotan.

[00276] Los anticuerpos anti-CD40 y los agentes descritos en este documento también son útiles para tratar o prevenir un cáncer que expresa CD40. Tratamiento o prevención de un cáncer que expresa CD40, según los métodos descritos en la presente, se logra mediante la administración a un sujeto en necesidad de tal tratamiento o prevención de una cantidad eficaz del anticuerpo anti-CD40 o agente, por el que el anticuerpo o agente (i) se une a las células cancerosas que expresan CD40 y (ii) ejerce un efecto citotóxico o citostático para agotar o inhibir la proliferación de las células cancerosas que expresan CD40.

[00277] Cánceres que expresan CD40 que se pueden tratar o prevenir mediante los métodos descritos en la presente incluyen, por ejemplo, leucemia, como la leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda (por ejemplo, mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, o eritroleucemia), leucemia crónica, leucemia mielocítica (granulocítica) crónica o leucemia linfocítica crónica, policitemia vera; Linfoma (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin o enfermedad de no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadena pesada; tumores sólidos tales como sarcomas y carcinomas (por ejemplo, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, osteosarcoma, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, carcinoma colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervical, cáncer de útero, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma,

pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, carcinoma nasofaríngeo, o carcinoma de esófago).

[00278] Composiciones farmacéuticas y Administración de las Mismas

[00279] Una composición que comprende un agente de unión a CD40 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40) se puede administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno inmunológico o un cáncer que expresa CD40. La invención proporciona además el uso de un agente de unión a CD40 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40) en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un cáncer que expresa CD40 o trastorno inmunológico. El término "sujeto" como se usa en la presente significa cualquier paciente mamífero al que un agente de unión a CD40 se puede administrar, incluyendo, por ejemplo, seres humanos y mamíferos no humanos, tales como primates, roedores y perros. Los sujetos destinados específicamente para el tratamiento utilizando los métodos descritos en la presente incluyen los seres humanos. Los anticuerpos o agentes pueden ser administrados solos o en combinación con otras composiciones en la prevención o el tratamiento del trastorno inmunológico o cáncer que expresa CD40.

[00280] Los anticuerpos preferidos para uso en dichas composiciones farmacéuticas son aquellos que comprenden anticuerpos humanizados o fragmentos de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de cualquiera de las SEC ID NO: 1 a 4, SEC ID NO: 27, SEC ID NO: 28, SEC ID NO: 29, SEC ID NO: 30, SEC ID NO: 32, SEC ID NO: 33, SEC ID NO: 34, SEC ID NO: 35, SEC ID NO: 37, SEC ID NO: 38, SEC ID NO : 39, o SEC ID NO: 40.

[00281] Algunas realizaciones incluyen polinucleótidos aislados que comprenden secuencias que codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera de SEC ID NO: 26, SEC ID NO: 31, o SEC ID NO: 36. Composiciones de anticuerpos humanizados particularmente preferidos comprenden un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEC ID NO: 27 y SEC ID NO: 26, respectivamente; SEC ID NO: 28 y SEC ID NO: 26, respectivamente; SEC ID NO: 29 y SEC ID NO: 26, respectivamente; SEC ID NO: 30 y SEC ID NO: 26, respectivamente; SEC ID NO: 32 y SEC ID NO: 31, respectivamente; SEC ID NO: 33 y SEC ID

NO: 31, respectivamente; SEC ID NO: 34 y SEC ID NO: 31, respectivamente; SEC ID NO: 35 y SEC ID NO: 31, respectivamente; SEC ID NO: 37 y SEC ID NO : 36, respectivamente; SEC ID NO: 38 y SEC ID NO: 36, respectivamente; SEC ID NO: 39 y SEC ID NO: 36, respectivamente; SEC ID NO: 40 y SEC ID NO: 36, respectivamente. Contemplado dentro de la presente invención son polinucleótidos aislados que codifican cualquiera de las secuencias de cadena pesada de SEC ID NO: 1 a 4, SEC ID NO: 27, SEC ID NO: 28, SEC ID NO: 29, SEC ID NO: 30, SEC ID NO: 32, SEC ID NO: 33, SEC ID NO: 34, SEC ID NO: 35, SEC ID NO: 37, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 39, SEC ID NO: 40, SEC ID NO : 42, SEC ID NO: 44, SEC ID NO: 46, SEC ID NO: 48, SEC ID NO: 53, SEC ID NO: 57, SEC ID NO: 58, SEC ID NO: 59, SEC ID NO: 60, SEC ID NO: 61, SEC ID NO: 62, SEC ID NO: 63, SEC ID NO: 64, SEC ID NO: 65, SEC ID NO: 66, SEC ID NO: 67, SEC ID NO: 68, SEC ID NO: 69, SEC ID NO: 70, SEC ID NO: 71, SEC ID NO: 72, o SEC ID NO: 73. Otras realizaciones están dirigidas a ácidos nucleicos aislados que codifican una secuencia de cadena ligera de cualquiera de las secuencias de SEC ID NO: 5 a SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 26, SEC ID NO: 31, SEC ID NO: 36, SEC ID NO: 41, SEC ID NO: 43, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 47, SEC ID NO: 49, SEC ID NO: 50, SEC ID NO: 51, SEC ID NO: 52, SEC ID NO : 54, SEC ID NO: 55, SEC ID NO: 56, SEC ID NO: 74, SEC ID NO: 75, o SEC ID NO: 76.

[00282] En ciertas realizaciones, donde el tratamiento de la AR se contempla, las composiciones de la invención pueden usarse en métodos para reducir los signos y síntomas, inducir una respuesta clínica importante y reducir la progresión del daño estructural en pacientes con AR activa moderada a severamente que no responden adecuadamente al MTX solo. Una tal terapia ejemplar actual es: Enbrel/Humira (Datos con Humira y Enbrel se obtuvieron en dos poblaciones de pacientes diferentes). Las composiciones de la presente invención pueden ser utilizadas en lugar de una terapia con Enbrel/Humira o en combinación con terapia con Enbrel/Humira para sujetos que no responden al MTX solo. Preferiblemente, en tales realizaciones, las composiciones de la invención tendrán una eficacia superior a Enbrel +MTX en pacientes que han tenido una respuesta inadecuada a metotrexato como se determina por ejemplo a través de: ACR20 a 6 meses >85% para compuesto más MTX (GS: Enbrel +MTX 71% vs Placebo + MTX 27%, Humira + MTX a 12 meses 59% vs placebo + MTX 24%) *. Criterios adicionales para una mayor eficacia de las composiciones de la invención pueden incluir: La inhibición de la progresión del daño estructural durante un período de un año similar a Enbrel

(Humira + MTX 0.1 vs. placebo + MTX 2.7* según puntuación Sharp modificada a las 52 semanas promedio). En aún otras realizaciones, las composiciones producen una "respuesta clínica importante" superior a Enbrel en pacientes que han tenido una respuesta inadecuada a metotrexato como se midió mediante ACR70 (20% para Humira + MTX, 4% para placebo + MTX) *.

[00283] En otras realizaciones, las composiciones de la invención pueden ser indicadas para reducir los signos y síntomas, inducir una respuesta clínica importante y reducir la progresión de daño estructural en pacientes con AR activa moderada a severamente que han tenido una respuesta inadecuada a agentes anti-TNF. El estándar de Oro actual: terapia biológica no anti-TNF. Preferiblemente, en tales sujetos las composiciones de la invención poseen eficacia no inferior en comparación con terapia biológica no anti-TNF (por ejemplo, Orencia, Rituxan) por comparación histórica en pacientes que han tenido una respuesta inadecuada a un agente anti-TNF: ACR20 a 6 meses > 50% para el compuesto más MARME (GS: Orencia MARME + 50% frente a placebo + MARME 20%). En aún otras realizaciones, las composiciones de la invención inhiben la progresión del daño estructural durante un período de un año evaluada por métodos aceptados de puntuación de rayos X para la erosión articular y estrechamiento del espacio articular, similar a Rituxan (Rituxan + MTX 0.1 vs. placebo + MTX 2.7* según puntuación Sharp modificada a las 52 semanas promedio).

[00284] Varios sistemas de entrega se conocen y se pueden utilizar para administrar el agente de unión a CD40. Los métodos de introducción incluyen, pero no están limitados a administración intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, y oral. El agente de unión a CD40 se puede administrar, por ejemplo por infusión, bolo o inyección, y se puede administrar junto con otros agentes biológicamente activos tales como agentes quimioterapéuticos. La administración puede ser sistémica o local. En realizaciones preferidas, la administración es mediante inyección subcutánea. Las formulaciones para tales inyecciones se pueden preparar, por ejemplo, en jeringas precargadas que pueden ser administradas una vez cada dos semanas.

[00285] Las características de seguridad de los anticuerpos de la invención se determinarán y preferiblemente incluyen una o más características tales como: interacciones adversas no clínicamente significativas con otros medicamentos comúnmente utilizados para

tratar la artritis reumatoide (MARMes por ejemplo, esteroides, AINE,); No mayor tasa de interrupciones debido a cuestiones de seguridad o tolerabilidad en comparación con Enbrel; Tasa de infecciones graves no mayor que agentes anti-TNF u otros agentes biológicos utilizados comúnmente; Frecuencia y/o severidad de reacciones en el sitio de inyección o infusión de reacción similar a Enbrel; Desarrollo nulo o mínimo de resistencia a los fármacos (menos de 5%) sobre ciclos repetidos de terapia; Ninguno o mínimos anticuerpos neutralizantes; Sin evidencia de agregación/activación de plaquetas mejorada que podría conducir a fenómenos tromboembólicos *in vivo* o disfunción plaquetaria/endotelial que podría conducir a sangrado.

[00286] En realizaciones específicas, la composición de agente de unión de CD40 se administra mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo el implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo una membrana, tal como una membrana sialástica, o una fibra. Típicamente, cuando se administra la composición, los materiales a los que el anticuerpo anti-CD40 o el agente no absorbe se utilizan.

[00287] En otras realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 o el agente se suministra en un sistema de liberación controlada. En una realización, una bomba puede ser utilizada (ver, por ejemplo, Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Sefton, 1989, CRCCrit. Ref. Biomed. Ing. Eng. 14:201; Buchwald, 1980, Surgery 88:507;.. Saudek, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). En otra realización, los materiales poliméricos se pueden utilizar. (Véase, por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release (Langer y Wise eds., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance (Smolen y eds Ball, Wiley, Nueva York, 1984);. Ranger y Peppas de 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61. Ver también Levy, 1985, Science 228:190;During, 1989, Ann..Neurol. 25:351; Howard, 1989, J. Neurosurg.. 71:105.) Otros sistemas de liberación controlada se discuten, por ejemplo, en Langer, supra.

[00288] Un agente de unión a la CD40 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40) se pueden administrar como composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del agente de unión y uno o más ingredientes farmacéuticamente compatibles.

[00289] En realizaciones típicas, la composición farmacéutica se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración

intravenosa o subcutánea a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración por inyección son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, el producto farmacéutico también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran ya sea por separado o mezclados juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o un sobre que indique la cantidad de agente activo. Cuando el farmacéutico se administra por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua de calidad farmacéutica estéril o solución salina. Cuando el farmacéutico se administra por inyección, una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina se puede proporcionar de manera que los ingredientes se pueden mezclar antes de la administración.

[00290] Además, la composición farmacéutica se puede proporcionar como un kit farmacéutico que comprende (a) un recipiente que contiene un agente de unión a CD40 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40) en forma liofilizada y (b) un segundo recipiente que contiene un diluyente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, agua estéril) para inyección. El diluyente farmacéuticamente aceptable puede ser utilizado para la reconstitución o dilución del anticuerpo anti-CD40 liofilizado o agente. Opcionalmente asociado con dicho recipiente (s) puede haber un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, que refleje la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para la administración humana.

[00291] La cantidad del agente de unión a CD40 (por ejemplo, anticuerpo anti-CD40) que es eficaz en el tratamiento o prevención de un trastorno inmunológico o cáncer que expresa CD40 se puede determinar mediante técnicas clínicas estándar. Además, ensayos in vitro pueden emplearse opcionalmente para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa a emplear en la formulación dependerá también de la vía de administración, y la etapa de trastorno inmunológico o cáncer que expresa CD40, y debe decidirse según el juicio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de respuesta a dosis derivadas de sistemas de prueba de modelo in vitro o animal.

[00292] Por ejemplo, la toxicidad y la eficacia terapéutica del anticuerpo anti-CD40 o el agente se puede determinar en cultivos celulares o en animales experimentales mediante procedimientos farmacéuticos estándar para determinar la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). Se prefiere un agente de unión a CD40 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40) que presenta un índice terapéutico grande. Cuando un agente de unión a CD40 exhibe efectos secundarios tóxicos, se puede utilizar un sistema de administración que dirija el agente de unión a CD40 para el sitio del tejido afectado para minimizar células que no expresan CD40 dañadas potenciales y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios.

[00293] Los datos obtenidos de los ensayos de cultivos celulares y estudios con animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación del agente de unión a CD40 normalmente se encuentra dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier agente de unión a CD40 usado en el método, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración plasmática circulante que incluya la IC₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición media máxima de los síntomas) como se determina en cultivo celular. Tal información puede ser utilizada para determinar más exactamente las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento, ELISA y similares.

[00294] Generalmente, la dosificación de un anticuerpo anti-CD40 o agente de unión a CD40 se administra a un paciente con un trastorno inmunológico o cáncer que expresa CD40 es típicamente alrededor de 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del sujeto. La dosis administrada a un sujeto es de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, o aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal del sujeto.

[00295] Las dosis de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, de 1 ng/kg a 100 mg/kg. En algunas realizaciones, una dosis es de aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg,

aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 11 mg/kg, aproximadamente 12 mg/kg, aproximadamente 13 mg/kg, aproximadamente 14 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg o aproximadamente 16 mg/kg. La dosis se puede administrar, por ejemplo, diariamente, una vez por semana (semanalmente), dos veces por semana, tres veces por semana, cuatro veces por semana, cinco veces por semana, seis veces a la semana, cada dos semanas o mensualmente, cada dos meses, o cada tres meses. En realizaciones específicas, la dosis es de aproximadamente 0,5 mg/kg/semana, aproximadamente 1 mg/kg/semana, aproximadamente 2 mg/kg/semana, aproximadamente 3 mg/kg/semana, aproximadamente 4 mg/kg/semana, aproximadamente 5 mg/kg/semana, aproximadamente 6 mg/kg/semana, aproximadamente 7 mg/kg/semana, aproximadamente 8 mg/kg/semana, aproximadamente 9 mg/kg/semana, aproximadamente 10 mg/kg/semana, aproximadamente 11 mg/kg/semana, aproximadamente 12 mg/kg/semana, aproximadamente 13 mg/kg/semana, aproximadamente 14 mg/kg/semana, aproximadamente 15 mg/kg/semana o aproximadamente 16 mg/kg/semana. En algunas realizaciones, la dosis varía de aproximadamente 1 mg/kg/semana a aproximadamente 15 mg/kg/semana.

[00296] En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden el agente de unión CD40 puede comprender además un agente terapéutico, ya sea conjugado o no conjugado al agente de unión. El anticuerpo anti-CD40 o agente de unión CD40 puede co-administrarse en combinación con uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento o prevención de trastornos inmunológicos o cánceres que expresan CD40. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un agente citostático, citotóxico o inmunosupresor. La terapia de combinación también puede incluir, por ejemplo, la administración de un agente que actúe sobre a un receptor o complejo de receptores distinto de CD40 en la superficie de los linfocitos activados, células dendríticas o células cancerosas que expresan CD40. Un ejemplo de tal agente incluye un segundo, anticuerpo no CD40 que se une a una molécula en la superficie de un linfocito activado, célula dendrítica o célula cancerosa que expresa CD40. Otro ejemplo incluye un ligando que se dirige a un receptor o complejo receptor. Típicamente, tal anticuerpo o ligando se une a un receptor de superficie celular en los linfocitos activados, células dendríticas o células cancerosas que expresan CD40 y aumenta el efecto citotóxico o citostático del anticuerpo anti-

CD40 mediante la entrega de una señal citostática o citotóxica en el linfocito activado, células dendríticas o célula cancerosa que expresan CD40.

[00297] Tal administración de terapia de combinación puede tener un efecto aditivo o sinérgico sobre parámetros de la enfermedad (por ejemplo, la gravedad de un síntoma, el número de síntomas, o la frecuencia de recaída).

[00298] Con respecto a los regímenes terapéuticos para la administración combinatoria, en una realización específica, un anticuerpo anti-CD40 o agente de unión a CD40 se administra simultáneamente con un agente terapéutico. En otra realización específica, el agente terapéutico se administra antes o después de la administración del anticuerpo anti-CD40 o agente de unión a CD40, por lo menos una hora y hasta varios meses, por ejemplo al menos una hora, cinco horas, 12 horas, un día, una semana, un mes, o tres meses, antes o después de la administración del anticuerpo anti-CD40 o agente de unión a CD40.

[00299] Clases útiles de agentes citotóxicos o inmunosupresores incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, auristatinas (por ejemplo, MMAE o MMAF), ligandos de unión al surco menor de ADN, inhibidores de replicación de ADN, agentes alquilantes (por ejemplo, complejos de platino tales como cis-platino, mono (platino), bis (platino) y complejos de platinotri-nucleares y carboplatino), antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizadores a quimioterapia, duocarmicinas, etoposides, pirimidinas fluoradas, ionóforos, lexitropsinas, nitrosoureas, platinoles, compuestos de pre-formación, antimetabolitos de purina, puromicinas, sensibilizadores de radiación, esteroides, taxanos, inhibidores de la topoisomerasa, alcaloides de vinca, o similares.

[00300] Agentes citotóxicos o inmunosupresores individuales incluyen, por ejemplo, un andrógeno, antramicina (AMC), Asparaginasa, 5-azacitidina, azatioprina, bleomicina, busulfano, sulfoximina de butionina, camptotecina, carboplatino, carmustina (BSNU), CC-1065, clorambucilo, cisplatino, colchicina, ciclofosfamida, citarabina, arabinósido de citidina, citocalasina B, dacarbazina, dactinomicina (anteriormente actinomicina), daunorubicina, decarbazina, docetaxel, doxorubicina, un estrógeno, 5-fluordeoxiuridina, 5-fluorouracilo, gramicidina D, hidroxiurea, idarubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina (CCNU), mecloretamina, melfalán, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitramicina, mitomicina C,

mitoxantrona, nitroimidazol, paclitaxel, plicamicina, procarbizina, estreptozotocina, tenopósido, 6-tioguanina, tiotepa, topotecán, vinblastina, vincristina, vinorelbina, VP-16 y VM 26.

[00301] En algunas realizaciones típicas, el agente terapéutico es un agente citotóxico. Agentes citotóxicos adecuados incluyen, por ejemplo, dolastatinas (por ejemplo, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE, AEB o AEVB), aglutinantes de surco menor de ADN (por ejemplo, enediinas y lexitropsinas), duocarmicinas, taxanos (por ejemplo, paclitaxel y docetaxel), puromicinas, alcaloides de la vinca, CC-1065, SN-38, topotecán, morfolinodoxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, equinomicina, combretastatina, netropsina, epotilona A y B, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, discodermolida, eleuterobina, o mitoxantrona.

[00302] En algunas realizaciones, el agente citotóxico es un agente quimioterapéutico convencional, tal como, por ejemplo, doxorrubicina, paclitaxel, melfalano, alcaloides de vinca, metotrexato, mitomicina C o etopósido. Además, los agentes potentes tales como análogos de CC-1065, caliqueamicina, maitansina, análogos de dolastatina 10, rizoxina, y palitoxina puede estar vinculado a los anticuerpos anti-CD40 o sus agentes.

[00303] En realizaciones específicas, el agente citotóxico o citostático es auristatina E (también conocido en la técnica como dolastatina-10) o un derivado dela misma. Típicamente, el derivado de auristatina E es, por ejemplo, un ester formado entre auristatina E y un cetoácido. Por ejemplo, auristatina E puede hacerse reaccionar con ácido paraacetilbenzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otros derivados típicos incluyen auristatina AFP, MMAF, y MMAE. La síntesis y estructura de la auristatina E y sus derivados se describen en, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU.Nos. 2004-0157782 A1 y 2005-0238649; Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US03/24209, Solicitud de Patente Internacional No PCT/US02/13435, y EE.UU. Pat. Nos. 6.884.869; 6.323.315; 6.239.104; 6.034.065; 5.780.588; 5.665.860; 5.663.149; 5.635.483; 5.599.902; 5.554.725; 5.530.097; 5.521.284; 5.504.191; 5.410.024; 5.138.036; 5.076.973; 4.986.988; 4.978.744; 4.879.278; 4.816.444; y 4.486.414; las descripciones de las cuales están incorporadas aquí como referencia.

[00304] En realizaciones específicas, el agente citotóxico es un agente de unión al surco menor de ADN. (Véase, por ejemplo, EE.UU. Pat. No. 6.130.237.) Por ejemplo, en algunas

realizaciones, el agente de unión al surco menor es un compuesto CBI. En otras realizaciones, el agente de unión al surco menor es una enediina (por ejemplo, caliqueamicina).

[00305] Ejemplos de agentes anti-tubulina incluyen, pero no están limitados a, taxanos (por ejemplo, Taxol® (paclitaxel), Taxotere® (docetaxel)), T67 (Tularik), alquiloides Vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina), y dolastatinas (por ejemplo, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB). Otros agentes antitubulina incluyen, por ejemplo, los derivados de bacatina, análogos de taxano (p.ej., epotilona A y B), nocodazol, colchicina y colcimida, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, combretastatinas, discodermolida, y eleuterobina.

[00306] En algunas realizaciones, el agente citotóxico es un maitansinoide, otro grupo de agentes anti-tubulina. Por ejemplo, en realizaciones específicas, el maitansinoide es maitansina o DM-1 (ImmunoGen, Inc.; véase también Chari, 1992, Cancer Res. 52:127-131).

[00307] En algunas realizaciones, el agente terapéutico no es un radioisótopo.

[00308] En algunas realizaciones, el agente citotóxico o inmunosupresor es un antimetabolito. El antimetabolito puede ser, por ejemplo, un antagonista de purina (por ejemplo, azotioprina o mofetilo de micofenolato), un inhibidor de la dihidrofolato reductasa (por ejemplo, metotrexato), aciclovir, ganciclovir, zidovudina, vidarabina, ribavarina, azidotimidina, arabinósido de citidina, amantadina, didesoxiuridina, yododesoxiuridina, poscamet o trifluridina.

[00309] En otras realizaciones, el agente citotóxico o inmunosupresor es ciclosporina, tacrolimus, o rapamicina. En otras realizaciones, el agente citotóxico es aldesleucina, alemtuzumab, alitretinoína, alopurinol, altretamina, amifostina, anastrozol, trióxido de arsénico, bexaroteno, calusterona bexaroteno, capecitabina, celecoxib, cladribina, Darbepoetina alfa, Denileucina diftitox, dexrazoxano, propionato de dromostanolona, epirubicina, epoetina alfa, estramustina, exemestano, Filgrastim, floxuridina, fludarabina, fulvestrant, gemcitabina, gemtuzumab ozogamicina, goserelina, idarubicina, ifosfamida, mesilato de imatinib, interferón alfa-2a, irinotecan, letrozol, leucovorina, levamisol, mecloretamina o mostaza nitrogenada, megestrol, mesna, metotrexato, metoxsaleno, mitomicina C, mitotano, fenpropionato de nandrolona, oprelvekin, oxaliplatino, pamidronato, pegademase, pegaspargasa, pegfilgrastim, pentostatina, pipobromano, plicamicina, porfímero de sodio, procarbazona, quinacrina, rasburicasa, revlimid, Sargramostim, estreptozocina, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido,

testolactona, tioguanina, toremifeno, tositumomab, Trastuzumab, tretinoína, mostaza de uracilo, valrubicina, vinblastina, vinorelbina, vincristina y zoledronato.

[00310] En realizaciones adicionales, el fármaco es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-HER2; RITUXAN (rituximab; Genentech, Inc., South San Francisco, California), un anticuerpo monoclonal quimérico anti-CD20); OVAREX (AltaRex Corporation, MA); PANOREX (Glaxo Wellcome, NC; un anticuerpo IgG2a murino); Cetuximab Erbitux (Imclone Systems Inc., NY; un anticuerpo anti-EGFR IgG quimérico); Vitaxina (MedImmune, Inc., MD); Campath I/H (LeukoSite, MA; un anticuerpo IgG1 humanizado); Smart MI95 (Protein Design Labs, Inc., CA; un anticuerpo IgG anti-CD33 humanizado); LymphoCide (Immunomedics, Inc., NJ; un anticuerpo IgG anti-CD22 humanizado); Smart ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA; un anticuerpo anti-HLA-DR); Oncolym (Techniclone, Inc., CA; un anticuerpo anti-HLA-DR10 murino radiomarcado); Allomune (Bio Transplant, CA; un anticuerpo anti-CD2 humanizado) ; Avastin (Genentech, Inc., CA; un anticuerpo anti-VEGF humanizado); Epratuzamab (Immunomedics, Inc., NJ y Amgen, CA; un anticuerpo anti-CD22), y CEAcide (Immunomedics, NJ; un anticuerpo anti-CEA humanizado).

[00311] Otros anticuerpos adecuados incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos contra los siguientes antígenos: CA125, CA15-3, CA19-9, L6, Lewis Y, Lewis X, alfa fetoproteína, CA 242, fosfatasa alcalina placentaria, antígeno específico de la próstata, fosfatasa de ácido prostático, factor de crecimiento epidérmico, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, receptor anti-transferrina, p97, MUC1-KLH, CEA, Gp100, MART1, antígeno específico de próstata, receptor IL-2, CD20, CD52, CD33, CD22, gonadotropina coriónica humana, CD38, mucina, P21, MPG, y producto Neu oncogén.

[00312] En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un agente inmunosupresor. El agente inmunosupresor puede ser, por ejemplo, ganciclovir, etanercept, tacrolimus, ciclosporina, rapamicina, ciclofosfamida, azatioprina, micofenolato mofetil o metotrexato. Alternativamente, el agente inmunosupresor puede ser, por ejemplo, un glucocorticoide (por ejemplo, cortisol y aldosterona) o un análogo de glucocorticoides (por ejemplo, prednisona o dexametasona).

[00313] Inhibidores de la ciclooxygenasa adecuados incluyen ácido meclofenámico, ácido mefenámico, carprofeno, diclofenaco, diflunisal, fenbufeno, fenoprofeno, ibuprofeno,

indometacina, ketoprofeno, nabumetona, naproxen, sulindac, tenoxicam, tolmetina, y ácido acetilsalicílico.

[00314] Los inhibidores adecuados de lipoxigenasa incluyen inhibidores de redox (por ejemplo, derivados de catecol butano, ácido nordihidroguaiarético (NDGA), masoprocol, fenidona, Ianopalen, indazolinonas, nafazatrom, benzofuranol, alquilhidroxilamina), e inhibidores no-redox (por ejemplo, hidroxitiazoles, metoxialquiltiazoles, benzopiranos y derivados de los mismos, metoxitetrahidropirano, ácidos boswéllicos y derivados acetilados de ácidos boswéllicos, y ácidos quinolinometoxifenilacético sustituidos con radicales de cicloalquilo), y precursores de los inhibidores de redox.

[00315] Otros inhibidores de la lipoxigenasa adecuados incluyen antioxidantes (por ejemplo, fenoles, galato de propilo, flavonoides y/o sustratos de origen natural que contienen flavonoides, derivados hidroxilados de las flavonas, flavonol, dihidroquercetina, luteolina, galangina, orobol, derivados de chalcona, 4,2', 4'-trihidroxichalcona, orto-aminofenoles, N-hidroxiureas, benzofuranoles, ebselen y especies que aumentan la actividad de las selenoenzimas reductoras), agentes quelantes de hierro (por ejemplo, ácidos hidroxámicos y sus derivados, N-hidroxiureas, 2-bencil-1-naftol, catecoles, hidroxilaminas, carnosol Trolox C, catecol, naftol, sulfasalazina, zileuton, ácido 5-hidroxiantranílico y ácido 4 - (omega-arilalquilo) fenilalcanoico), compuestos que contienen imidazol (por ejemplo, ketoconazol e itraconazol), fenotiazinas y derivados de benzopirano .

[00316] Sin embargo, otros inhibidores de la lipoxigenasa adecuados incluyen inhibidores de eicosanoides (por ejemplo, ácidos octadecatetraenoico, eicosatetraenoicos, docosapentaenoico, eicosahexaenoico y docosahexanoico y ésteres de los mismos, PGE1 (prostaglandina E1), PGA2 (prostaglandina A2), viprostol, ácidos 15-monohidroxieicosatetraenoico, monohidroxi-15-eicosatrienoico y 15-monohidroxieicosapentaenoico, y leucotrienos B5, C5 y D5), compuestos de interferencia con los flujos de calcio, fenotiazinas, difenilbutilaminas, verapamil, fuscósido, curcumina, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico (ETYA), hidroxifenilretinamida, lonapalen, esculina, dietilcarbamazina, fenantrolina, baicaleína, proxicromil, tioéteres, sulfuro de dialilo y sulfuro de di-(1-propenilo).

[00317] Antagonistas del receptor de leucotrieno incluyen calcitriol, ontazolast, Bayer Bay-x-1005, Ciba-Geigy CGS-25019C, ebselen, Leo Denmark ETH-615, Lilly LY-293111, Ono ONO-4057, Terumo TMK-688, Boehringer Ingelheim BI-RM-270, Lilly LY 213024, Lilly LY 264086, Lilly LY 292728, Ono ONO LB457, Pfizer 105696, Perdue Frederick PF 10042, Rhône-Poulenc Rorer RP 66153, SmithKline Beecham SB-201146, SmithKline Beecham SB-201993, SmithKline Beecham SB-209247, Searle SC-53228, Sumitamo SM 15178, American Home Productos WAY 121006, Bayer Bay-o-8276, Warner-Lambert CI-987, Warner-Lambert IC-987BPC15LY-223982, Lilly LY 233569, Lilly LY-255283, MacroNex MNX-160, Merck and Co. MK-591, Merck and Co. MK-886, Ono ONO-LB-448, Purdue Frederick PF-5901, Rhône-Poulenc Rorer RG 14893, Rhone-Poulenc Rorer RP 66364, Rhone-Poulenc Rorer RP 69698, Shionoogi S-2474, Searle SC-41930, Searle SC-50505, Searle SC-51146, Searle SC-52798, SmithKline Beecham y SK 104493-F, Leo Denmark SR-2566, Tanabe 757-T y Teijin TEI-1338.

[00318] Artículos de fabricación

[00319] En otro aspecto, se incluye un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es efectiva para tratar la condición y puede tener un puerto de acceso estéril. Por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica. El agente activo en la composición es el anticuerpo anti-CD40 humanizado. La etiqueta en o asociada con el recipiente indica que la composición se utiliza para tratar la condición de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un buffer farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros buffers, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para su uso.

[00320] La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar el alcance de la invención.

[00321] EJEMPLOS

[00322] Ejemplo 1: Producción del anticuerpo anti-CD40 humanizado

[00323] Los anticuerpos murinos 20E2, y 2H11 se muestran en las Tablas 1 y 2 anteriormente en este documento. La humanización de los clones 20E2, y 2S11 ha concluido. Se hizo una biblioteca donde los residuos humanos y murinos se variaron de tal manera que, en cualquier posición dada, podría haber un residuo humano o murino. Dicha biblioteca se hizo para aquellos aminoácidos que fueron diferentes entre la línea germinal humana y el anticuerpo murino. Solamente los clones que retienen la función del anticuerpo precursor murino fueron seleccionados.

[00324] De esta manera, el Anticuerpo A, Anticuerpo B y Anticuerpo C fueron anticuerpos humanizados derivados de anticuerpo de ratón 20E2 (Anticuerpo A y Anticuerpo B) o 2S11 (Anticuerpo C) clonado en un un formato de IgG1-KO(knock-out)/kappa humana. IgG1-KO tiene dos mutaciones en la región Fc, Leu234Ala y Leu235Ala para reducir Fc γ R y la unión de complemento.

[00325] Los resultados de tal humanización resultaron en diversas secuencias humanizadas variables de cadena pesada y ligera mostradas a continuación:

[00326] SEC ID NO: 41 (secuencia variable de cadena ligera):

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWHQKPGQPPKLLIYWTST
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGTKVEIK

[00327] SEC ID NO: 42 (secuencia variable de cadena pesada):

EVQLVKSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGNRII
YYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWGQGT
LTVSS

[00328] SEC ID NO: 43 (secuencia variable de cadena ligera)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWHQKPGQPPKLLIYWTST
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGTKVEIK

[00329] SEC ID NO: 44 (secuencia variable de cadena pesada)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGNRII
YYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTL
VTVSS

[00330] SEC ID NO: 45 (secuencia variable de cadena ligera)

DIVMTQSPDSLAVSLGEKVTMNCSSQSLLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLIYWTS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGAGTKVEIK

[00331] SEC ID NO: 46 (secuencia de cadena pesada variable)

EVQLVESGGGLVKPGGSRRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGNRII
YYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWGQGT
LTVTVSS.

[00332] SEC ID NO: 47 (secuencia variable de cadena ligera)

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCSSQSLLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLIYWTS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGKVEIK

[00333] SEC ID NO: 48 (secuencia de cadena pesada variable)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGNRII
YYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWGQGT
LTVTVSS

[00334] SEC ID NO: 49 (secuencia de cadena ligera variable)

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCSSQSLLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLIYWTS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGAGTKVEIK

[00335] SEC ID NO: 50 (secuencia variable de cadena ligera)

EVQLVESGGGLVKPGGSRRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGNRII
YYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGT
LTVTVSS

[00336] SEC ID NO: 51 (secuencia variable de cadena ligera)

DIVMTQSPDSLAVSLGEKVTMNCSSQSLLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLIYWTS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDLAVYYCQNDYTYPLTFGAGTKVEIK.

[00337] SEC ID NO: 52 (secuencia variable de cadena ligera)

DIVMTQSPDSLAVSLGEKVTINCKSSQSLNNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLIYWTST
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGKVEIK

[00338] SEC ID NO: 53 (secuencia variable de cadena pesada)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGNRII
YYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTL
VTVSS

[00339] SEC ID NO: 54 (secuencia variable de cadena ligera)

QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMLWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPAR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRTFYPYTFGGGKVEIK

[00340] SEC ID NO: 55 (secuencia variable de cadena ligera)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMLWFQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPAR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRTFYPYTFGGGKVEIK

[00341] SEC ID NO: 56 (secuencia variable de cadena ligera)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMLWFQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRTFYPYTFGGGKVEIK

[00342] SEC ID NO: 57 (secuencia variable de cadena pesada)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQRPGQGLEWMGRIDPEDGD
SKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLV
TVSS.

[00343] SEC ID NO: 58 (secuencia variable de cadena pesada)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAPGQGLEWMGRIDPEDGD
SKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLV
TVSS

[00344] SEC ID NO: 59 (secuencia variable de cadena pesada)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQRPGQGLEWMGRIDPEDGD
SKYAPKFQGKVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLV
TVSS.

[00345] SEC ID NO: 60 (secuencia variable pesada encontrada)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAPGQGLEWIGRIDPEDGDS
KYAPKFQGKATMTADTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLVT
VSS

[00346] SEC ID NO: 61 (secuencia pesada variable)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQAPGQGLEWMGRIDPEDGD
SKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLV
TVSS

[00347] SEC ID NO: 62 (secuencia pesada variable):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQRPGQGLEWMGRIDPEDGD
TKFAPKFQGKATMTADTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLVT
VSS

[00348] SEC ID NO: 63 (secuencia pesada variable)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQRPGQGLEWMGRIDPEDGD
TKFAPKFQGKVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLVT
VSS

[00349] SEC ID NO: 64 (secuencia pesada variable)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAPGQGLEWIGRIDPEDGDT
KFAPKFQGKATMTADTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLVT
VSS

[00350] SEC ID NO: 65 (secuencia pesada variable)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAPGQGLEWMGRIDPEDGD
TKFAPKFQGKATMTADTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLVT
VSS

[00351] SEC ID NO: 66 (secuencia pesada variable)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQAPGQGLEWMGRIDPEDGD
TKFAPKFQGKATMTADTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLVT
VSS

[00352] SEC ID NO: 67 (secuencia pesada variable)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDYIHWVKQRPKGKLEWMGRIDPEDGDT
KYDPKFQGRVTMTADTSTD TAYMELSSLRSED AVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTTVT
VSS

[00353] SEC ID NO: 68 (secuencia pesada variable)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIKDYIHWVKQRPKGKLEWMGRIDPEDGDT
KYDPKFQGRVTMTADTSTD TAYMELSSLRSED AVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTTVT
VSS

[00354] SEC ID NO: 69 (secuencia pesada variable)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIKDYIHWVKQRPKGKLEWMGRIDPEDGDT
KYDPKFQGKVTMTADTSTD TAYMELSSLRSED AVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTTVT
VSS

[00355] SEC ID NO: 70 (secuencia pesada variable)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIKDYIHWVKQAPGKLEWMGRIDPEDGDT
KYDPKFQGKATMTADTSTD TAYMELSSLRSED AVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTTVT
VSS

[00356] SEC ID NO: 71 (secuencia pesada variable)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIKDYIHWVKQRPKGKLEWMGRIDPEDGDT
KYDPKFQGKATMTADTSTD TAYMELSSLRSED AVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTTVT
VSS

[00357] SEC ID NO: 72 (secuencia pesada variable)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIKDYIHWVKQAPGKGLEWIGRIDPEDGDTK
YDPKFQGGKATMTADTSTDATAYMELSSLRSEDATVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTTVT
SS

[00358] SEC ID NO: 73 (secuencia pesada variable)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDYIHWVQQAPGKGLEWMGRIDPEDGDT
KYDPKFQGRVTMTADTSTDATAYMELSSLRSEDATVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTTVT
VSS

[00359] SEC ID NO: 74 (secuencia ligera variable) 1 a partir del anticuerpo 10F2Hum:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSYILWFQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRTFYPYTFGGGTKVEIK

[00360] SEC ID NO: 75 (secuencia ligera variable) 2 a partir del anticuerpo 10F2Hum:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSYILWFQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPARF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRTFYPYTFGGGTKVEIK

[00361] SEC ID NO: 76 (secuencia ligera variable)

QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSYILWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPARF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRTFYPYTFGGGTKVEIK

[00362] Los anticuerpos humanizados de ejemplo de la presente invención son los que tienen las secuencias de cadena pesada y ligera establecidas en la siguiente tabla. Las secuencias en negrita subrayadas en la siguiente tabla son los dominios variables mientras que las secuencias normales, no subrayadas son los dominios constantes:

Identidad	Secuencia	SEC ID NO:
Anticuerpo A (Cadena Ligera)	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTW</u> <u>HQOKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS</u> <u>SLQAEDVAVYYCONDYTYPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFI</u> FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	26
Anticuerpo A (Cadena Pesada, IgG1KO)	<u>EVOLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTLVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	27
Anticuerpo A (Cadena Pesada, IgG1)	<u>EVOLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTLVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS	28

	KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
Anticuerpo A (Cadena Pesada, IgG4DM)	<u>EVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASGFTFS</u> <u>SDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDN</u> <u>AKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGT</u> <u>LVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNV HKPSNTKVDKRVESEKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	29
Anticuerpo A (Cadena Pesada, IgG1KOb)	<u>EVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASGFTFS</u> <u>SDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDN</u> <u>AKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGT</u> <u>LVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	30
Anticuerpo B (Cadena Ligera)	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGEKVTINCKSSQSLLNSGNOKNYL</u> <u>TWHQOKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFT</u> <u>LTISLSQAEDVAVYYCONDYTYPLTFGGG</u> <u>TKVEIKRTVA</u> APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	31
Anticuerpo B (Cadena Pesada, IgG1KO)	<u>EVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASGFTFS</u> <u>SDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDN</u> <u>AKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGT</u> <u>LVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	32
Anticuerpo B (Cadena	<u>EVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASGFTFS</u> <u>SDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDN</u> <u>AKNSLYLQ</u>	33

Pesada, IgG1)	<u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGLTVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
Anticuerpo B (Cadena Pesada, IgG4 DM)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGLTVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKRVEPKSGYGPCCPAPAEFEFGGPSVFLFP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	34
Anticuerpo B (Cadena Pesada, IgG1KOb)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGLTVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	35
Anticuerpo C (Cadena Ligera)	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMLWFQ</u> <u>QKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTL</u> <u>TISSLQPEDFATYYCQORTFYPTFGGGTKVEIKRT</u> VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	36
Anticuerpo C (Cadena Pesada, IgG1KO)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED TAVYYCTTSYYVGTGYWGQGLTVTVSSASTKG</u> PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH	37

	KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
Anticuerpo C (Cadena Pesada, IgG1)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED</u> <u>AVYYCTTSYYVGT</u> <u>YGYWGQGTL</u> <u>TVSS</u> ASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	38
Anticuerpo C (Cadena Pesada,IgG4 DM)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED</u> <u>AVYYCTTSYYVGT</u> <u>YGYWGQGTL</u> <u>TVSS</u> ASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	39
Anticuerpo C (Cadena Pesada, IgG1KOb)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED</u> <u>AVYYCTTSYYVGT</u> <u>YGYWGQGTL</u> <u>TVSS</u> ASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	40

[00363] Las regiones variables se subclonaron en uno o dos diferentes vectores de expresión apropiados de IgG:

[00364] A) un un formato de IgG1-KO(knock-out)/kappa humana con una mutación doble Leu234Ala, Leu235Ala en la región Fc para reducir la función efectora tal como la unión de FcγR y complemento.

[00365] B) un formato IgG4 -DM (doble mutante)/kappa humana con una mutación Ser228Pro en la región de bisagra para reducir la ocurrencia de hemi-moléculas de IgG4 y una mutación Leu235Glu para reducir aún más la unión de FcγR.

[00366] Los dos candidatos Anticuerpo A y Anticuerpo B fueron purificados y evaluados por los siguientes criterios:

- Aparición de CCF (Turbidez)
- Propiedades de filtración de CCF
- Rendimiento de la rProteinA
- Turbidez al eluir y neutralizar
- Agregados solubles (SEC)
- Patrón de pureza/contaminación (SDS)
- Patrón de carga (IEF)

[00367] **Ejemplo 2: Datos in vitro**

[00368] El Anticuerpo A, Anticuerpo B y Anticuerpo C se caracterizaron junto con los anticuerpos 4D11 (Kirin/ Astellas) y PG-102 (PanGenetics) que fueron producidos sobre la base de secuencias publicadas. Datos para el anticuerpo A, anticuerpo B, Anticuerpo C y 4D11 se muestran a continuación. PG-102 mostró una actividad agonista y sólo inhibición incompleta de la proliferación de linfocitos B (no se muestra). La Tabla 2.2. resume los datos obtenidos. Una descripción más detallada de los datos sigue la tabla 2.2.

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

Parámetro/Ensayo	Anticuerpo A	Anticuerpo B	Anticuerpo C	4D11
Kd +/- hu. Suero	<100 pM	<100 pM	<100 pM	<100 pM
Unión celular (EC50/nM ± SD)	1.2 (±0.28)	1.5 (±0.68)	1.7 (±0.28)	0.9 (±0.3)

Proliferación de linfocitos B: Antagonismo (IC50/nM±SD)	0.3 (±0.13)	0.2 (±0.10)	0.1 (±0.004)	0.03 (±0.02)
Proliferación de linfocitos B: agonismo (SI *) (IC50/nM±SD)	No agonismo (SI <2)	No agonismo (SI <2)	No agonismo (SI <2)	No agonismo (SI <2)
Células Dendríticas/IL- 12/23p40 Antagonismo (IC50/nM ± SD)	<1 nM	<1 nM	<1 nM	<1 nM
Células Dendríticas /IL- 12/23p40 Agonismo	No agonismo	No agonismo	No agonismo	No agonismo
Entrecruzamiento de especies: Unión de Hu/Cyno (relaciones de EC50**)	3	2	1	No se ha probado

* SI, Índice de Estimulación; ** Ratio> 1 significa unión aumentada a cyno en comparación con humano

[00369] A. Unión de anticuerpos humanizados a CD40 celular y proteína CD40 recombinante

[00370] La unión específica de anticuerpos humanizados a CD40 celular fue analizada por citometría de flujo utilizando células humanas HEK293 CD40-transfectadas. Se observó unión dependiente de la concentración del anticuerpo A, Anticuerpo B, y Anticuerpo C. Los anticuerpos presentaron un perfil de unión similar al mostrado en la Figura 1B. Los valores de EC50 de los anticuerpos de la presente invención y el anticuerpo 4D11 de Kirin están todos en el mismo rango de ~ 1 nM que es más probable en el límite de sensibilidad del ensayo debido a los altos niveles de CD40 en las células transfectadas. La unión específica de anticuerpos

humanizados a CD40 celular en células Ramos humanas también demostró unión dependiente de la concentración. Los anticuerpos mostraron perfiles de unión ligeramente diferentes (que se muestran en la Figura 2) y valores EC50 entre 0.21-1.22 nM. No se detectó unión a CD40 en las células negativas tales como células HEK293 no transfectadas o la línea celular T HSB-2 confirmando de este modo la unión selectiva a CD40 (datos no mostrados).

[00371] La afinidad de unión del Anticuerpo A, Anticuerpo B y Anticuerpo C a la proteína CD40-Fc humana se midió a través de ForteBio Octet y reveló constantes de disociación (K_D) de <100 pM. Debido a la bivalencia de los anticuerpos y CD40-Fc, los efectos de la avididad previene que un K_D por debajo de 100 pM sea determinado de manera precisa. Además, la unión a CD40-Fc se analizó en ausencia y en presencia de 50% de suero humano y no se observó ningún efecto significativo del suero sobre la unión (datos no mostrados)

[00372] B. Activity de anticuerpos humanizados en ensayos de activación/proliferación de linfocitos B

[00373] La actividad de los anticuerpos humanizados se probó en un ensayo de proliferación de linfocitos B en el cual los linfocitos B humanos derivados de la sangre periférica son estimulados con CD40L recombinante en presencia de IL-2 y IL-4. Anticuerpo A, Anticuerpo B y Anticuerpo C mostraron una potente inhibición de la proliferación de linfocitos B (que se muestra en las Figuras 3A y 3B). La comparación con las curvas de inhibición y los valores de CI50 de anticuerpos de BI y el anticuerpo 4D11 de Kirin, indica que el anticuerpo 4D11 tiene una mayor potencia (Figura 3B y 4) cuando se prueba a través de múltiples donantes. Cuando se ensayó para actividad agonista en ausencia del anticuerpo CD40L, Anticuerpo A, Anticuerpo B y Anticuerpo C no indujeron ninguna proliferación de linfocitos B por encima de los niveles de fondo en concentraciones de hasta 10 µg/ml (67 nM) (mostrado en la Figura 4) similar para el anticuerpo 4D11.

[00374] El anticuerpo 4D11 competidor que pareció ser ligeramente más potente con un CI50 promedio de ~ 0,02 nM y la ausencia de efectos agonistas. Los datos para los tres anticuerpos BI y 4D11 se resumen en la Figura 4 y la Tabla 2.2 anterior. Otro anticuerpo competidor, PG-102 (derivado del clon 5D12), también probado en este ensayo, presentó efectos agonistas significativos estimulando la proliferación de linfocitos B en ausencia de CD40L

(Figura 4). Por lo tanto, la falta de actividad agonista de los candidatos principales claramente los diferencia de PG-102.

[00375] En un segundo ensayo, los anticuerpos se evaluaron para la inhibición de la regulación positiva de CD86 en linfocitos B humanos. En este caso, el ensayo se puede realizar con sangre humana entera o en linfocitos B purificados, en presencia de CD40L exógeno. De acuerdo con los datos de proliferación de linfocitos B, Anticuerpo A, Anticuerpo B y Anticuerpo C probados en sangre entera humana mostraron una potente inhibición de la regulación positiva de CD86 mediada por CD40, medida por la citometría de flujo (que se muestra en la Figura 5). El Anticuerpo C mostró una potencia similar a 4D11 en este ensayo, mientras que la potencia de B y el anticuerpo A fue un poco más débil. La comparación del Anticuerpo B y 4D11 en linfocitos B purificados o en sangre entera, muestra que la potencia del Anticuerpo B (valores IC50 e IC90) relativamente no cambió por linfocitos B purificados en comparación con los linfocitos B en presencia de otras células portadoras de CD40 o suero, mientras 4D11 sufre un cambio dramático en la potencia en condiciones de sangre entera (mostrado en la Figura 6).

[00376] Datos similares se han desarrollado cuando Anticuerpo B, Anticuerpo A, y Anticuerpo C fueron evaluados para la inhibición de regulación positiva de CD86 en los linfocitos B de mono cynomolgus cuando se realizó con muestras de sangre entera (como se muestra en la Figura 7). Anticuerpo B, Anticuerpo A y anticuerpo C ensayados en sangre entera de mono cynomolgus mostraron una potente inhibición de la regulación positiva de CD86 mediada por CD40 medida por citometría de flujo. Por lo tanto todos éstos anticuerpos muestran reactividad cruzada funcional a CD40 de mono cynomolgus con una potencia similar a CD40 humano.

[00377] La actividad del anticuerpo B IgG1KOb y Anticuerpo B IgG1WT se evaluaron para la capacidad de mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Figura 13). En este ensayo, las células Ramos se incubaron con PBMC humano en una proporción de efector a célula diana de 50:1. El Anticuerpo B IgG1KOb y el Anticuerpo B IgG1WT se titularon a partir de 20 ug/ml y el grado de muerte celular se monitoreó mediante la liberación de LDH. Los datos mostrados son de un experimento representativo. Los datos muestran que el anticuerpo A IgG1Wt 20E2-12-RIgG1WT es un mediador eficaz de ADCC y que el Anticuerpo B IgG1KOb que contiene las mutaciones que eliminan la función efectora no tiene actividad ADCC.

[00378] Ejemplo 3: Estudios farmacocinéticos/farmacodinámicos

[00379] A. Administración Intravenosa de dosis única del Anticuerpos A y Anticuerpo a 1 o 10 mg/kg en Monos Cynomolgus.

[00380] El Anticuerpo A y Anticuerpo B fueron cada uno dosificados a 1 y 10 mg/kg IV a monos cynomolgus machos, (N = 3)/dosis. Se recolectaron muestras de sangre desde 0 a 504 hr (3 semanas), se recuperó el suero, y las muestras fueron almacenadas a -20 ° C hasta su análisis. Las muestras se analizaron por ELISA tipo sándwich como se describe anteriormente. Los perfiles concentración sérica-tiempo de ambos anticuerpos en monos después de las dos dosis IV y los parámetros farmacocinéticos se resumen en la Figura 8 y las Tablas 2.7.1 (Anticuerpo A) y 2.7.2 (Anticuerpo B) mostradas a continuación.. Ambos anticuerpos mostraron farmacocinética dosis-dependiente lo que sugiere que a bajas dosis, la depuración es predominantemente atribuible en ser consistente con una disposición mediada por el objetivo mientras a dosis mayores, el anticuerpo es depurado principalmente por el catabolismo. Perfiles farmacocinéticos similares dependientes de dosis se han observado para otros MAb que se enfocan sobre objetivos asociados con membrana (por ejemplo, CD19, CD20, EGFR, CD146 y HER2). La depuración para el Anticuerpo A fue de 0.8 y 0.1 mL/h/kg para dosis de 1 y 10 mg/kg, respectivamente. La depuración para el Anticuerpo B fue de 0.7 y 0,1 ml/h/kg para las dosis de 1 y 10 mg/kg, respectivamente. De manera similar, la vida media del anticuerpo A fue de 1 y 13 días para las dosis de 1 y 10 mg/kg, respectivamente y la vida media del Anticuerpo B fue de 2 y 13 días para las mismas dosis respectivas. Aunque el anticuerpo B tuvo una vida media marginalmente mayor en la dosis más baja con relación a la misma dosis para el Anticuerpo A, no se esperaría que esta diferencia se tradujera en una exposición más sostenida después de la administración crónica. AUC para ambos compuestos fue supraproporcional y el volumen de distribución (Vss) para ambos compuestos se aproximó al volumen de plasma (~ 40 ml/kg) que exhibe la distribución de tejido limitada típicamente observada en grandes terapéuticos polares proteicos. En general, no hubo diferencias apreciables en los parámetros farmacocinéticos entre los dos anticuerpos.

Tabla 2.7.1: Parámetros farmacocinéticos del anticuerpo A en monos cynomolgus machos, (N = 3)/dosis después de dosis intravenosas únicas de 1 y 10 mg/kg.

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

Tabla 2.7.2: Parámetros farmacocinéticos del Anticuerpos B en monos cynomolgus machos (N = 3)/dosis después de dosis únicas de 1 y 10 mg/kg.

Dosis (mg/kg)	CLp (ml/h/kg)	Vss (ml/kg)	AUC (μM.hr)	T1/2 (días)	MRT (días)
1	0.7 ± 0,16	40 ± 2	10,1 ± 2.7	1.5 ± 0.2	2.6 ± 0,8
10	0.09 ± 0.01	41 ± 6	744 ± 55	13.3 ± 3.0	19.3 ± 4.2

[00381] B. Estudio farmacodinámico Ex vivo

[00382] Como parte del estudio PK descrito anteriormente se analizaron los efectos farmacodinámicos de los anticuerpos anti-CD40. Para esto se incubaron muestras de sangre entera con CD40L recombinante durante la noche y el aumento de la expresión de CD86 en linfocitos B se determinó por citometría de flujo. Las muestras se analizaron en el día 0 (pre-tratamiento), día 2, 7 y 14 después de la dosificación. Aunque el aumento en la expresión de CD86 es relativamente pequeño (~ 5-20 %) se observó efecto dosis- dependiente (mostrado en la Figura 9). En el grupo de animales dosificados con 10 mg/kg de anticuerpo A y anticuerpo B, la inducción de CD86 se inhibió completamente a los 2, 7 y 14 días en consonancia con la exposición sostenida a esta dosis. Los animales dosificados con 1 mg/kg mostraron una inhibición completa en el día 2, inhibición parcial en el día 7 y no hubo inhibición en el día 14. La pérdida del efecto farmacodinámico en el tiempo se correlaciona con la depuración más rápida del anticuerpo en el grupo de dosis baja.

[00383] Ejemplo 4: Estudios toxicológicos relacionados: CD40 en plaquetas

[00384] CD40 se expresa constitutivamente en plaquetas humanas (Henn,, 2001) (Inwald,, 2003), mientras CD40L es rápida y transitoriamente expresado en la superficie celular de las plaquetas activadas (Henn,, 2001). Mientras no se espera que los anticuerpos anti-CD40 sin unión de Fc γ R tengan efectos sobre las plaquetas, es importante demostrar directamente que éste es el caso. Se realizaron estudios de citometría de flujo para para demostrar la unión de los candidatos de plomo anti-CD40 con plaquetas humanas y de cynomolgus..

[00385] Se ha demostrado previamente mediante citometría de flujo que anticuerpos monoclonales anti-CD40 G28.5 y mAb 89 se unen a plaquetas humanas en reposo Se ha demostrado previamente mediante citometría de flujo que anticuerpos monoclonales anti-CD40 G28.5 y mAb 89 se unen a plaquetas humanas en reposo (Henn,, 2001). Esto se confirmó mediante el anticuerpo G28.5 marcado con FITC. Se prepararon diluciones seriadas 5x de G28.5 y un rango de 0.5 μ g/ml a 0.32ng/ml se incubó en 100 μ l de plaquetas obtenidas de humanos (2 donantes) o monos cynomolgus (3 donantes) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Además, el anticuerpo anti-CD45 APC marcado se utilizó para identificar plaquetas unidas a otros tipos de células CD40⁺ a fin de excluir a estas células del análisis. Después de la tinción de anticuerpos, las plaquetas se lavaron y se fijaron con Optilyse C y se realizó citometría de flujo. La intensidad de fluorescencia media (IMF) se determinó como una medida de la unión del anticuerpo a plaquetas CD45.

[00386] 5c3 comercialmente disponible y anticuerpos monoclonales murinos anti-CD40 seleccionados de la invención fueron rotulados con FITC. La unión a células Ramos fue confirmada. El número de moléculas de FITC por molécula de anticuerpo osciló 2 a 4 FITC por molécula de anticuerpo. Se prepararon diluciones seriadas 5x del anticuerpo anti-CD40 comercial y candidato en el rango de 0.5 μ g/ml a 0.32 ng/ml y se incubaron con plaquetas humanas (3 donantes) y cynomolgus (2 donantes) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

[00387] Un gráfico representativo que demuestra la unión del anticuerpo anti-CD40 candidato de ratón a plaquetas humanas se muestra en la Figura 11. Los cuatro anticuerpos monoclonales candidatos presentaron unión específica a plaquetas humanas en comparación con el anticuerpo de control de isotipo marcado con FITC. 10F2, 2S11, 19B10 y 20E2 demostraron

unión comparable a las plaquetas. Una tendencia similar se observó para las plaquetas cynomolgus (datos no mostrados).

[00388] Además de estos estudios, el anticuerpo B directamente marcado y 4D11 fueron comparados para la capacidad de unirse a plaquetas y linfocitos B en muestras de sangre entera de mono cynomolgus y humana (como se muestra en la Figura 12). 4D11 mostró unión similar (como se ejemplificó por EC50) tanto a linfocitos B como a plaquetas en las muestras de sangre humana y de mono cynomolgus. El anticuerpo B mostró un patrón similar, pero con una potencia de unión mucho más débil.

[00389] Ejemplo 5: En estudios de farmacología in vivo en el modelo de ratón NSG

[00390] La eficacia de los anticuerpos humanizados, Anticuerpos A, se evaluó en un modelo de producción de anticuerpos donde PBMCs humanos se inyectaron en ratones GSN inmunodeficientes con el fin de generar una respuesta de injerto contra huésped. La producción significativa de IgM(hIgM) e IgG (hIgG) humanos puede detectarse a las dos 2 semanas después de los injertos. El tratamiento con el Anticuerpo A a dosis de 5 y 1 mg/kg, inhibió significativamente la respuesta de hIgG y hIgM en las semanas 2 y 3 después del injerto. Un anticuerpo comparador (4D11) se evaluó a una única dosis de 5 mg/kg y también demostró la anulación de la respuesta. En un segundo estudio, todos los anticuerpos Anticuerpo A, anticuerpos B y Anticuerpo C se probaron a una única dosis de 1 mg/kg y mostraron inhibición completa de la respuesta de IgM e IgG en la semana 2 (Figura 10).

[00391] Ejemplo 6: Análisis de biomarcadores

[00392] Regulación positiva del receptor: la regulación positiva de receptores inducida por CD40L puede ser medida por citometría de flujo. La sangre entera humana puede ser estimulada con concentración optimizada de CD40L soluble y el porcentaje total de CD20 + Receptor + células puede medirse por citometría de flujo. El cambio en porcentaje de la expresión de CD86 en las células CD20 positivas se midió en paralelo con el estudio PK cyanomologous evaluando los Anticuerpos A y B (Figura 9). Los datos muestran inhibición de regulación positiva de CD86 en puntos de tiempo consistentes con la exposición de los anticuerpos.

[00393] Proteómicos Dirigidos: El aumento de la secreción de las proteínas ante la estimulación de CD40 en sangre entera se puede utilizar como biomarcador potencial (s). Una concentración óptima de CD40L soluble y el tiempo de estimulación fueron establecidos utilizando la plataforma de esferas Luminex que detecta MDC/CCL22 y varias otras proteínas secretadas. Las muestras clínicas se evalúan a partir de sangre humana entera en el rango de dosis completa de anticuerpos monoclonales anti-CD40.

[00394] Ocupación de Receptores: La ocupación de receptores CD40 puede determinarse en un ensayo *in vitro* o *ex vivo* con base en el análisis de citometría de flujo de linfocitos B en sangre humana entera. Candidatos actuales: el anticuerpo de la presente invención y anticuerpo anti-CD40 no competitivo 5C3 se pueden usar para cuantificar el ensayo de ocupación de receptores.

[00395] Ejemplo 7: Actividad Antitumoral de Anticuerpo Anti-CD40 Humanizado

[00396] En algunos casos, puede ser deseable determinar las propiedades antitumorales de los anticuerpos de la presente invención. Tal determinación puede ser hecha probando la actividad antitumoral del anticuerpo humanizado anti-CD40 en un modelo xenográfico de linfoma murino SCID. Tal modelo SCID puede ser inyectado con células de cáncer para que presente un tumor, por ejemplo, 5×10^6 millones de células tumorales se pueden inyectar por vía subcutánea en ratones SCID (10/grupo) trece días antes de comenzar el tratamiento farmacológico. Anticuerpos anti-CD40 murinos de la presente invención o una comparación (por ejemplo, un anticuerpo de control u otro anticuerpo humanizado) se administra por vía intraperitoneal 3 veces por semana (4 mg/kg/dosis) con 8 o 5 dosis administradas. El desarrollo y crecimiento de los tumores se monitorean en el ratón y el volumen del tumor puede medirse cada semana durante el periodo de estudio seleccionado, por ejemplo, periodo de estudio de 14 días. Preferiblemente, los resultados muestran un aumento de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces en el crecimiento de tumores en ratones de control en comparación con los ratones tratados con los anticuerpos de la presente invención. Preferiblemente, durante el período de tratamiento, el crecimiento del tumor en ratones tratados con los anticuerpos de la invención será insignificante. Tales datos pueden corroborar que el anticuerpo humanizado que se prueba es eficaz en la supresión del crecimiento tumoral en este modelo xenográfico de linfoma B.

[00397] Ejemplo 8: Supervivencia Prolongada Mediante Anticuerpo anti-CD40 Humanizado

[00398] La eficacia del anticuerpo anti-CD40 humanizado sobre la supervivencia de ratones portadores de tumores tales como los descritos anteriormente puede probarse en un modelo xenográfico de linfoma murino SCID. Los ratones SCID (10/grupo) se inocularon por vía intravenosa con 1×10^6 millones de células tumorales tres días antes de tratamiento con el anticuerpo. Luego los ratones se trataron con los anticuerpos anti-CD40 murinos o humanizados de la presente invención o un control Ig, administrados por vía intraperitoneal dos veces por semana (4 mg/kg/dosis) para un total de cinco dosis. Luego las jaulas de ratón se examinaron diariamente para mortalidad para determinar el nivel de eficacia de los anticuerpos en la prolongación de la supervivencia de un sujeto con cáncer.

[00399] Diversas referencias, incluyendo las solicitudes de patentes, patentes y publicaciones científicas, se citan en la presente, cuyas divulgaciones se incorporan en la presente como referencia en su totalidad. La cita o identificación de cualquier referencia en este documento no se interpretará como una admisión de que tal referencia está disponible como estado de la técnica anterior a la presente invención.

[00400] Aspectos preferidos de la presente invención pueden describirse según las realizaciones en los siguientes párrafos:

[00401] Párrafo 1. Un anticuerpo monoclonal humanizado en el que dicho anticuerpo se une específicamente a CD40 humano que tiene una actividad antagonista de IC₅₀ de menos de 1 nM y no tiene agonismo hasta 100 µg/ml en la proliferación de linfocitos B y en donde dicho anticuerpo se caracteriza además en que el anticuerpo tiene una vida media in vivo en primates no humanos que es al menos 10 días.

[00402] Párrafo 2. El anticuerpo monoclonal humanizado del párrafo 1 en donde dicho anticuerpo tiene una vida media en monos cynomolgus de más de 8 días a una dosis de menos de 30 mg/kg.

[00403] Párrafo 3. El anticuerpo de párrafo 1, en donde el anticuerpo comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consta de cualquiera de las SEC ID NO:

1 a SEC ID NO: 4 y una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consta de cualquiera de las SEC ID No.: 5 a SEC ID NO: 8.

[00404] Parrafo 4. El anticuerpo del párrafo 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión de antígenos de un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de cualquiera de las SEC ID No: 1 a 4, SEC ID NO: 27, SEC ID NO: 28, SEC ID NO: 29, SEC ID NO: 30, SEC ID NO: 32, SEC ID NO: 33, SEC ID NO: 34, SEC ID NO: 35, SEC ID NO: 37, SEC ID NO : 38, SEC ID NO: 39, SEC ID NO: 40, SEC ID NO: 42, SEC ID NO: 44, SEC ID NO: 46, SEC ID NO: 48, SEC ID NO. 50 SEC ID NO: 53, SEC ID NO: 57, SEC ID NO: 58, SEC ID NO: 59, SEC ID NO: 60, SEC ID NO: 61, SEC ID NO: 62, SEC ID NO: 63, SEC ID NO: 64, SEC ID NO: 65, SEC ID NO: 66, SEC ID NO: 67, SEC ID NO: 68, SEC ID NO: 69, SEC ID NO: 70, SEC ID NO: 71, SEC ID NO : 72, o SEC ID NO: 73.

[00405] Parrafo 5. El anticuerpo párrafo 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión de antígenos de un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera de la SEC ID NO: 5 a SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 26, SEC ID NO: 31, SEC ID NO: 36, SEC ID NO: 41, SEC ID NO: 43, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 47, SEC ID NO: 49, SEC ID NO: 50, SEC ID NO: 51, SEC ID NO: 52, SEC ID NO: 54, SEC ID NO: 55, SEC ID NO: 56, SEC ID NO: 74, SEC ID NO: 75, o SEC ID NO: 76.

[00406] Párrafo 6. El anticuerpo monoclonal de párrafo 1, en el que dicho anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde la secuencia CDR1 de cadena pesada CDR1 se selecciona del grupo que consta de SEC ID NO: 9 a SEC ID NO: 11, una cadena secuencia CDR2 de cadena pesada seleccionada del grupo que consta de SEC ID NO: 12 a SEC ID NO: 15 y una secuencia CDR3 de cadena pesada seleccionada del grupo que consta de SEC ID NO: 16 a SEC ID NO: 17, y en donde la secuencia CDR1 de cadena ligera tiene una secuencia seleccionada del grupo que consta de SEC ID NO: 18 a SEC ID NO: 21, una secuencia CDR2 de cadena ligera de SEC ID NO: 22 a SEC ID NO: 23 y una secuencia CDR3 de cadena ligera seleccionada entre el grupo que consta de SEC ID NO: 24 a SEC ID NO: 25.

[00407] Párrafo 7. El anticuerpo monoclonal del Párrafo 1, en el que dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR1 de cadena pesada de SEC ID NO: 10, una secuencia CDR2 de cadena pesada de SEC ID NO: 13 y una secuencia CDR3 de cadena pesada de SEC ID NO: 16 y en el que dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR1 de cadena ligera de SEC ID NO: 19, una secuencia CDR2 de cadena ligera de SEC ID NO: 22 y una secuencia CDR3 de cadena ligera de SEC ID NO: 24.

[00408] Párrafo 8. El anticuerpo monoclonal del párrafo 1, en el que dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR1 de cadena pesada de SEC ID NO: 9, una secuencia CDR2 de cadena pesada de SEC ID NO: 14 y una secuencia CDR3 de cadena pesada de SEC ID NO: 16 y en el que dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR1 de cadena ligera de SEC ID NO: 20, una secuencia CDR2 de cadena ligera de SEC ID NO: 22 y una secuencia CDR3 de cadena ligera de SEC ID NO: 24.

[00409] Párrafo 9. Un anticuerpo anti-CD40 que comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada de cualquiera de las SEC ID NOs: 1 a 4.

[00410] Párrafo 10. Un anticuerpo anti-CD40 comprende una secuencia de dominio variable de cadena ligera de cualquiera de las SEC ID NO: 5 a SEC ID NO: 8.

[00411] Párrafo 12. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado que tiene un dominio variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEC ID NO: 27 y SEC ID NO: 26, respectivamente; SEC ID NO: 28 y SEC ID NO: 26, respectivamente; SEC ID NO: 29 y SEC ID NO: 26, respectivamente; SEC ID NO: 30 y SEC ID NO: 26, respectivamente; SEC ID NO: 32 y SEC ID NO: 31, respectivamente; SEC ID NO: 33 y SEC ID NO: 31, respectivamente; SEC ID NO: 34 y SEC ID NO: 31, respectivamente; SEC ID NO: 35 y SEC ID NO: 31, respectivamente; SEC ID NO: 37 y SEC ID NO: 36, respectivamente; SEC ID NO: 38 y SEC ID NO: 36, respectivamente; SEC ID NO: 39 y SEC ID NO: 36, respectivamente; SEC ID NO: 40 y SEC ID NO: 36, respectivamente.

[00412] Párrafo 13. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión de antígenos que se une específicamente a CD40 humano, que comprende un dominio variable de cadena pesada humanizado que comprende una región variable que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la región variable de la secuencia de

aminoácidos de cadena pesada de dominio variable humana de SEC ID NO: 27, SEC ID NO: 28, SEC ID NO: 29 o SEC ID NO: 30, y que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera al menos 90% idéntica a un dominio variable de cadena ligera correspondiente de la SEC ID NO: 26.

[00413] Párrafo 14. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión de antígenos que se une específicamente a CD40 humano, que comprende un dominio variable de cadena pesada humanizado que comprende una región variable que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la región variable de la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de dominio variable humana de SEC ID NO: 32, SEC ID NO: 33, SEC ID NO: 34 o SEC ID NO: 35, y que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera al menos 90% idéntica a una variable de cadena ligera correspondiente de la SEC ID NO: 31.

[00414] Párrafo 15. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión de antígenos que se une específicamente a CD40 humano, que comprende un dominio variable de cadena pesada humanizado que comprende una región variable que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la región variable de la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de dominio variable humana de SEC ID NO: 37, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 39 o SEC ID NO: 40, y que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera al menos 90% idéntica a una cadena ligera correspondiente de la SEC ID NO: 36.

[00415] Párrafo 16. El anticuerpo del Párrafo 1, en donde dicho anticuerpo no estimula la producción de citoquinas a partir de linfocitos B en ausencia de CD40L.

[00416] Párrafo 17. El anticuerpo del Párrafo 1, en donde dicho anticuerpo se une a CD40 humano en presencia de suero humano al 50% con una reducción en la tasa de menos de dos veces.

[00417] Párrafo 18. El anticuerpo del Párrafo 1, en donde dicho anticuerpo produce la inhibición de la producción de IgM e IgG en un mamífero a una concentración de 1 mg/kg.

[00418] Párrafo 19. Un método de bloqueo de la función de CD40 humano en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una composición que comprende un

anticuerpo del Párrafo 1 en una cantidad suficiente para bloquear una respuesta inmune mediada por CD40 en dicho mamífero.

[00419] Párrafo 20. Un método para tratar o mejorar la enfermedad de injerto contra huésped en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una composición que comprende un anticuerpo del Párrafo 1 en una cantidad suficiente para disminuir uno o más de los síntomas de la enfermedad de injerto contra huésped en dicho animal .

[00420] Párrafo 21. El método del párrafo 20, en donde dicho mamífero tiene una enfermedad autoinmune o inflamatoria seleccionada a partir del grupo que consta de artritis reumatoide, esclerosis múltiple, glomerulonefritis lúpica proliferativa, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), psoriasis, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), enfermedad de Crohn y lupus eritematoso sistémico (LES), tiroiditis de Hashimoto, mixedema primaria, tirotoxicosis/enfermedad de Graves, anemia perniciosa, gastritis atrófica autoinmune, carditis autoinmune, enfermedad de Addison, menopausia prematura, diabetes mellitus tipo 1, síndrome de Goodpasture, miastenia gravis, anemia hemolítica autoinmune, leucopenia idiopática, cirrosis biliar primaria, hepatitis crónica activa (HBs Ag negativo), cirrosis criptogénica, síndrome de Sjogren, dermatomiositis, esclerodermia, enfermedad mixta del tejido conectivo, lupus eritematoso discoide, y vasculitis sistémica.

[00421] Párrafo 22. El método del Párrafo 19, en donde dicho mamífero tiene artritis reumatoide.

[00422] Párrafo 23. El método del Párrafo 20, que comprende además administrar un segundo agente terapéutico seleccionado del grupo que consta de un antagonista de TNF, un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad, un antagonista de CTLA4, un anticuerpo monoclonal dirigido al receptor anti-IL-6 y un anticuerpo monoclonal anti-CD20.

[00423] Párrafo 24. Un método según el Párrafo 20, donde dicha enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmune es una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmune que se asocia con células que expresan tanto CD40 como CD20.

[00424] Párrafo 25. El método del Párrafo 19, en donde dicho anticuerpo anti-CD40 se administra por una vía de administración parenteral.

[00425] Párrafo 26. El método del párrafo 19, en donde dicho anticuerpo anti-CD40 se administra por vía intravenosa o subcutánea.

[00426] Párrafo 27. Un método de inhibición de la producción de anticuerpos a partir de linfocitos B en un paciente humano que comprende administrar a dicho paciente humano una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD40 del Párrafo 1.

[00427] Párrafo 28. El método del Párrafo 27, en donde dicho paciente humano tiene una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmune que está asociada con las células que expresan CD40.

[00428] Párrafo 29. El método del Párrafo 27, en donde dicho paciente humano padece una enfermedad autoinmune seleccionada del grupo que consta de enfermedad autoinmune o inflamatoria seleccionada a partir del grupo que consta de artritis reumatoide, esclerosis múltiple, glomerulonefritis lúpica proliferativa, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), psoriasis, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), enfermedad de Crohn y lupus eritematoso sistémico (LES), tiroiditis de Hashimoto, mixedema primaria, tirotoxicosis/enfermedad de Graves, anemia perniciosa, gastritis atrófica autoinmune, carditis autoinmune, enfermedad de Addison, menopausia prematura, diabetes mellitus tipo 1, síndrome de Goodpasture, miastenia grave, anemia hemolítica autoinmune, leucopenia idiopática, cirrosis biliar primaria, hepatitis crónica activa (HBs Ag negativo), cirrosis criptogénica, síndrome de Sjogren, dermatomiositis, esclerodermia, enfermedad mixta del tejido conectivo, lupus eritematoso discoide, y vasculitis sistémica.

[00429] Párrafo 30. Un método para inhibir el crecimiento de células que expresan antígeno CD40 humano, que comprende administrar el anticuerpo o fragmento de unión de antígenos del Párrafo 1 a las células, en donde el anticuerpo o fragmento de unión de antígenos se une específicamente al antígeno CD40 de superficie celular humana, en donde la unión del anticuerpo o fragmento de unión de antígenos al antígeno CD40 inhibe el crecimiento o la diferenciación de las células.

[00430] Párrafo 31. Un método para tratar un sujeto que tiene un trastorno asociado a CD40, que comprende administrar al sujeto el anticuerpo o fragmento de unión de antígenos del Párrafo 1, cuyo anticuerpo o fragmento de unión de antígenos se une específicamente a CD40

humano, en donde la unión del anticuerpo o fragmento de unión de antígenos a CD40 inhibe el crecimiento o diferenciación de las células de la enfermedad asociada a CD40.

[00431] Párrafo 32. El método del Párrafo 31, en donde las células del trastorno asociado a CD40 son células linfoblastoides B, células pancreáticas, células pulmonares, células de mama, células de ovario, células de colon, células de próstata, células de piel, células de cabeza y cuello, células de vejiga, células óseas o células de riñón.

[00432] Párrafo 33. El método del Párrafo 31, en donde el trastorno asociado a CD40 es la leucemia linfocítica crónica, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, linfoma de células T, linfoma no-Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, macroglobulinemia de Waldenstrom o sarcoma de Kaposi.

[00433] Párrafo 34. Un método para inducir la depleción de linfocitos B periféricos, que comprende administrar a las células el anticuerpo o fragmento de unión de antígenos del Párrafo 1, cuyo anticuerpo o fragmento de unión de antígenos se une específicamente a un antígeno CD40 de superficie celular humana, en donde la unión del anticuerpo o fragmento de unión de antígenos al antígeno CD40 induce la depleción de las células.

[00434] Párrafo 35. El método del Párrafo 34, en donde el anticuerpo o fragmento de unión de antígenos se administra a un sujeto que tiene un trastorno de inmunodeficiencia.

[00435] Párrafo 36. El método del Párrafo 34, en donde el trastorno inmune es artritis reumatoide o lupus eritematoso sistémico.

[00436] Párrafo 37. Un método de tratamiento de la artritis reumatoide en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto un anticuerpo del Párrafo 1, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo antagonista que bloquea la función de CD40 en dicho sujeto.

[00437] Párrafo 38. El método del Párrafo 37, en donde dicho anticuerpo se administra en una cantidad eficaz para inhibir la diferenciación de linfocitos B y cambios de isotipos de anticuerpos en dicho sujeto.

[00438] Párrafo 39. El método del Párrafo 37, en donde dicho anticuerpo se administra en una cantidad eficaz para inhibir la producción de citoquinas y quimioquinas y la regulación de moléculas de adhesión en las células T y los macrófagos en dicho sujeto.

[00439] Párrafo40. El método del Párrafo 37, en donde dicho anticuerpo se administra en una cantidad eficaz para inhibir la activación de las células dendríticas en dicho sujeto.

[00440] Párrafo41. El método del Párrafo 37, en donde dicho anticuerpo se administra en una cantidad eficaz para inhibir la producción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, metaloproteinasas de la matriz, prostaglandinas, y regular de manera negativa las moléculas de adhesión en las células no inmunes en dicho sujeto.

[00441] Párrafo 42. El método del Párrafo 37, en donde dicho anticuerpo se administra en combinación con un régimen que comprende la administración de metotrexato y/o la administración de Enbrel/Humira.

[00442] Párrafo 43. El método del Párrafo 37, en donde dicho sujeto es un sujeto que tiene artritis reumatoide y no ha respondido al tratamiento con solo metotrexato.

[00443] Párrafo 44. El método del Párrafo 43, en donde dicho método comprende tratar a dicho sujeto con un régimen que comprende la administración de metotrexato y/o la administración de Enbrel/Humira.

[00444] Párrafo 45. El método del Párrafo 37, en donde el tratamiento de dicho sujeto con dicho anticuerpo anti-CD40 antagonista tiene una eficacia superior al tratamiento con solo metotrexato, solo Enbrel, una combinación de Enbrel + metotrexato.

[00445] Párrafo 46. El método del Párrafo 43, en donde el tratamiento de dicho sujeto con dicho anticuerpo anti-CD40 antagonista tiene una eficacia superior al tratamiento con Enbrel + metotrexato en pacientes que han tenido una respuesta inadecuada a metotrexato.

[00446] Párrafo 47. El método del Párrafo 37, en donde dicho anticuerpo se administra en combinación con un régimen que comprende un agente anti-TNF.

[00447] Párrafo48. El método del Párrafo 37, en donde dicho sujeto es un sujeto que tiene artritis reumatoide y no ha respondido al tratamiento con solo un agente anti-TNF.

[00448] Párrafo 49. El método del Párrafo 48 en donde dicho método comprende tratar a dicho sujeto con un régimen que comprende tratamiento con un agente anti-TNF en combinación con dicho anticuerpo anti-CD40 antagonista.

[00449] Párrafo 50. El método del Párrafo 37, en donde el tratamiento de dicho sujeto con dicho anticuerpo anti-CD40 antagonista tiene una eficacia superior al tratamiento con un agente anti-TNF.

[00450] Párrafo 51. El método del párrafo 48, en donde el tratamiento de dicho sujeto con dicho anticuerpo anti-CD40 antagonista tiene una eficacia superior al tratamiento con Orencina o Rituxan en pacientes que han tenido una respuesta inadecuada a solo un agente anti-TNF.

[00451] Párrafo 52. Una composición farmacéutica que comprende: (i) el anticuerpo o fragmento de unión de antígenos del Párrafo 8, y (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[00452] Párrafo 53. Una composición farmacéutica del Párrafo 52 en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión de antígenos del mismo se conjuga con un segundo agente.

[00453] Párrafo 54. La composición farmacéutica del Párrafo 52 en donde dicho segundo agente es un agente citotóxico, un vehículo PEG, una enzima o un marcador.

[00454] Párrafo 55. Un polinucleótido aislado que codifica una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de cualquiera de las SEC ID N °: 1 a 4, SEC ID NO: 27, SEC ID NO: 28, SEC ID NO: 29, SEC ID NO: 30, SEC ID NO : 32, SEC ID NO: 33, SEC ID NO: 34, SEC ID NO: 35, SEC ID NO: 37, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 39, SEC ID NO: 40, SEC ID NO: 42, SEC ID NO: 44, SEC ID NO: 46, SEC ID NO: 48, SEQ ID. NO. 50, SEC ID NO: 53, SEC ID NO: 57, SEC ID NO: 58, SEC ID NO: 59, SEC ID NO: 60, SEC ID NO: 61, SEC ID NO: 62, SEC ID NO: 63, SEC ID NO: 64, SEC ID NO: 65, SEC ID NO: 66, SEC ID NO: 67, SEC ID NO: 68, SEC ID NO: 69, SEC ID NO: 70, SEC ID NO: 71, SEC ID NO: 72, o SEC ID NO: 73.

[00455] Párrafo 56. Un polinucleótido aislado que codifica una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de cualquiera de las SEC ID NO: 5 a SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 26, SEC ID NO: 31, SEC ID NO: 36, SEC ID NO: 41, SEC ID NO: 43, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 47, SEC ID NO: 49, SEC ID NO: 50, SEC ID NO: 51, SEC ID NO: 52, SEC ID NO: 54, SEC ID NO: 55, SEC ID NO: 56, SEC ID NO: 74, SEC ID NO: 75, o SEC ID NO: 76.

[00456] Párrafo 57. Un uso de un anticuerpo del Párrafo 1 en la fabricación de un medicamento para el bloqueo de la función de CD40 humano en un mamífero en donde el medicamento bloquea una respuesta inmune mediada por CD40 en dicho mamífero.

[00457] Párrafo 58. Un uso de un anticuerpo del Párrafo 1 para la fabricación de un medicamento para tratar o mejorar la enfermedad de injerto contra huésped en un mamífero.

[00458] Párrafo 59. El uso del Párrafo 58, en donde dicho medicamento se fabrica para el tratamiento de una enfermedad autoinmune o inflamatoria seleccionada a partir del grupo que consta de artritis reumatoide, esclerosis múltiple, glomerulonefritis lúpica proliferativa, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), psoriasis, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), enfermedad de Crohn y lupus eritematoso sistémico (LES), tiroiditis de Hashimoto, mixedema primaria, tirotoxicosis/enfermedad de Graves, anemia perniciosa, gastritis atrófica autoinmunitaria, carditis autoinmune, enfermedad de Addison, menopausia prematura, diabetes mellitus tipo 1, síndrome de Goodpasture, miastenia grave, anemia hemolítica autoinmune, leucopenia idiopática, cirrosis biliar primaria, hepatitis crónica activa (HBs Ag negativo), cirrosis criptogénica, síndrome de Sjogren, dermatomiositis, esclerodermia, enfermedad mixta del tejido conectivo, lupus eritematoso discoide, y vasculitis sistémica.

[00459] Párrafo 60. Un uso según el Párrafo 58 en donde dicho medicamento comprende además un segundo agente terapéutico seleccionado a partir del grupo que consta de un antagonista del TNF, un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad, un antagonista de CTLA4, un anticuerpo monoclonal dirigido al receptor anti-IL-6 y un anticuerpo monoclonal anti-CD20.

[00460] Párrafo 61. Un uso según el Párrafo 57 en donde dicho medicamento se fabrica para usar una vía de administración parenteral.

[00461] Párrafo 62. Un uso según el Párrafo 57 en donde dicho medicamento se fabrica para uso por vía intravenosa o subcutánea.

[00462] Párrafo 63. Un uso de un anticuerpo del Párrafo 1 en la fabricación de un medicamento para la inhibición de la producción de anticuerpos a partir de linfocitos B en un paciente humano.

[00463] Párrafo 64. Un uso de un anticuerpo del Párrafo 1 para la fabricación de un medicamento para inhibir el crecimiento y/o diferenciación de células que expresan el antígeno CD40 humano.

[00464] Párrafo 65. Un uso de un anticuerpo del Párrafo 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno asociado con CD40 en donde la unión del anticuerpo o fragmento de unión de antígenos en donde dicho medicamento a CD40 inhibe el crecimiento o diferenciación de las células del trastorno asociado a CD40.

[00465] Párrafo 66. Un uso según el Párrafo 65, en donde el medicamento se usa para el tratamiento de un trastorno de las células asociadas a CD40 a partir de células linfoblastoides B, células pancreáticas, células pulmonares, células de mama, células de ovario, células de colon, células de próstata, células de piel, células de cabeza y cuello, células de vejiga, células óseas o células de riñón.

[00466] Párrafo 67. El uso según el párrafo 65, en donde el medicamento se utiliza para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, linfoma de células T, linfoma no de Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, macroglobulinemia de Waldenstrom o sarcoma de Kaposi.

[00467] Párrafo 68. Un uso de un anticuerpo del párrafo 1 en la fabricación de un medicamento para inducir la depleción de linfocitos B periféricos en donde el anticuerpo o fragmento de unión de antígenos del medicamento se une específicamente a un antígeno CD40 de superficie celular humana, en donde la unión del anticuerpo o fragmento de unión de antígenos al antígeno CD40 induce la depleción de las células.

[00468] Párrafo 69. El uso de acuerdo con el párrafo 68, en donde el medicamento es para el tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno de inmunodeficiencia.

[00469] Párrafo 70. El uso según el párrafo 68, en donde el medicamento es para el tratamiento de artritis reumatoide o lupus eritematoso sistémico.

[00470] Párrafo 71. Un uso de un anticuerpo del párrafo 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de artritis reumatoide en un sujeto.

[00471] Párrafo 72. El uso según el párrafo 71, en donde el medicamento es para la inhibición de diferenciación de linfocitos B y cambios de isotipos de anticuerpos en dicho sujeto.

[00472] Párrafo 73. El uso según el Párrafo 71, en donde el medicamento es para la inhibición de la producción de citoquinas y quimioquinas y la regulación positiva de moléculas de adhesión en células T y macrófagos en dicho sujeto.

[00473] Párrafo 74. El uso según el párrafo 71 en donde el medicamento es para la inhibición de la activación de las células dendríticas en dicho sujeto.

[00474] Párrafo 75. El uso según el párrafo 71 en donde el medicamento es para la inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, metaloproteinasas de la matriz, prostaglandinas, y regulación negativa de moléculas de adhesión en las células no inmunes en dicho sujeto.

[00475] Párrafo 76. El uso según el Párrafo 71, en donde el medicamento es un medicamento de combinación para ser administrado con un regimen que comprende administración de metotrexato y/o administración de Enbrel/Humira.

[00476] Párrafo 77. El uso según el Párrafo 71, en donde el medicamento comprende además un agente anti-TNF.

[00477] La aplicación de las enseñanzas descritas en este documento no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas en la presente. En efecto, diversas modificaciones estarán dentro de las capacidades de un experto normal en la técnica a la luz de las enseñanzas contenidas en la presente y ejemplos que la acompañan. Tales modificaciones se pretende que caigan dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humanizado o fragmento de unión de antígenos de un anticuerpo en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión de antígenos del anticuerpo se une específicamente a CD40 humano que tenga un IC50 de actividad antagonista de menos de 1 nM y que no tenga agonismo hasta de 100 µg/ml en la proliferación de linfocitos B y en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión de antígenos del anticuerpo se caracteriza además en que el anticuerpo o fragmento de unión de antígenos del anticuerpo tiene una vida media en vivo en primates no humanos de por lo menos 10 días, y en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión de antígenos del anticuerpo opcionalmente tiene una vida media en monos cynomolgus de más de 8 días a una dosis de menos de 30 mg/kg.

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende una secuencia de cadena pesada y, opcionalmente una secuencia de cadena ligera, en donde la secuencia de cadena pesada se selecciona del grupo que consta de:

a) cualquier secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 1 a la SEC ID NO: 4; y

b) cualquier secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 27, SEC ID NO: 28, SEC ID NO: 29, SEC ID NO: 30, SEC ID NO: 32, SEC ID NO: 33, SEC ID NO: 34, SEC ID NO: 35, SEC ID NO: 37, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 39, SEC ID NO: 40, SEC ID NO: 42, SEC ID NO: 44, SEC ID NO: 46, SEC ID NO : 48, SEC ID NO. 50 SEC ID NO: 53, SEC ID NO: 57, SEC ID NO: 58, SEC ID NO: 59, SEC ID NO: 60, SEC ID NO: 61, SEC ID NO: 62, SEC ID NO: 63, SEC ID NO: 64, SEC ID NO: 65, SEC ID NO: 66, SEC ID NO: 67, SEC ID NO: 68, SEC ID NO: 69, SEC ID NO: 70, SEC ID NO: 71, SEC ID NO : 72, o SEC ID NO: 73;

y

en donde la secuencia de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de:

a) cualquiera de las SEC ID NO: 5 a SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 26, SEC ID NO: 31, SEC ID NO: 36, SEC ID NO: 41, SEC ID NO: 43, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 47,

SEC ID NO: 49, SEC ID NO: 50, SEC ID NO: 51, SEC ID NO: 52, SEC ID NO: 54, SEC ID NO: 55, SEC ID NO: 56, SEC ID NO: 74, SEC ID NO: 75 y SEC ID NO: 76.

3. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la secuencia de la cadena pesada y la secuencia de la cadena ligera se seleccionan entre el grupo que consta de:

a) la secuencia CDR1 de cadena pesada seleccionada del grupo que consta de SEC ID NO: 9 a SEC ID NO: 11, una secuencia CDR2 de cadena pesada seleccionada del grupo que consta de SEC ID NO: 12 a SEC ID NO: 15 y una secuencia CDR3 de cadena pesada seleccionada del grupo que consta de SEC ID NO: 16 a SEC ID NO: 17; y la secuencia CDR1 de cadena ligera tiene una secuencia seleccionada del grupo que consta de SEC ID NO: 18 a SEC ID NO: 21, una secuencia CDR2 de cadena ligera de la SEC ID NO: 22 a SEC ID NO: 23 y una secuencia CDR3 de cadena ligera seleccionada del grupo que consta de SEC ID NO: 24 a SEC ID NO: 25;

b) una secuencia CDR1 de cadena pesada de SEC ID NO: 10, una secuencia CDR2 de cadena pesada de SEC ID NO: 13 y una secuencia CDR3 de cadena pesada de la SEC ID NO: 16 y secuencia una cadena ligera CDR1 de SEC ID NO: 19, una secuencia CDR2 de cadena ligera CDR2 de SEC ID NO: 22 y una secuencia CDR3 de cadena ligera de SEC ID NO: 24;

c) una secuencia CDR1 de cadena pesada de SEC ID NO: 9, una secuencia CDR2 de cadena pesada de SEC ID NO: 14 y una secuencia CDR3 de cadena pesada de SEC ID NO: 16 y en donde dicho anticuerpo comprende una secuencia CDR1 de cadena ligera de SEC ID NO: 20, una secuencia CDR2 de cadena ligera de SEC ID NO: 22 y una secuencia CDR3 de cadena ligera de SEC ID NO: 24; y

d) un dominio variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos SEC ID NO: 27 y SEC ID NO: 26, respectivamente; SEC ID NO: 28 y SEC ID NO: 26, respectivamente; SEC ID NO: 29 y SEC ID NO: 26, respectivamente; SEC ID NO: 30 y SEC ID NO: 26, respectivamente; SEC ID NO: 32 y SEC ID NO: 31, respectivamente; SEC ID NO: 33 y SEC ID NO: 31, respectivamente; SEC ID NO: 34 y

SEC ID NO: 31, respectivamente; SEC ID NO: 35 y SEC ID NO: 31, respectivamente; SEC ID NO: 37 y SEC ID NO: 36, respectivamente; SEC ID NO: 38 y SEC ID NO: 36, respectivamente; SEC ID NO: 39 y SEC ID NO: 36, respectivamente; SEC ID NO: 40 y SEC ID NO: 36, respectivamente.

4. El anticuerpo aislado o fragmento de unión de antígenos de la reivindicación 1 que se une específicamente al CD40 humano, que comprende un dominio variable de cadena pesada humanizada y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera, en donde el dominio variable de cadena pesada y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera se selecciona del grupo constituido por:

a) un dominio variable de cadena pesada humanizado que comprende una región variable que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la región variable de la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de dominio variable de SEC ID NO: 27, SEC ID NO: 28, SEC ID NO: 29 o SEC ID NO: 30, y que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera al menos 90% idéntica a un dominio variable de la cadena ligera correspondiente de SEC ID NO: 26;

b) el dominio variable humanizado de cadena pesada que comprende una región variable que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la región variable de la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de dominio variable humano de la SEC ID NO: 32, SEC ID NO : 33, SEC ID NO: 34 o SEC ID NO: 35, y que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera al menos 90% idéntica a una variable de cadena ligera correspondiente de la SEC ID NO: 31; y

c) un dominio variable de cadena pesada humanizada que comprende una región variable que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la región variable de la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de dominio variable humano de la SEC ID NO: 37, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 39 o SEC ID NO: 40, y que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera al menos 90% idéntica a una cadena ligera correspondiente de la SEC ID NO: 36.

5. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde dichos anticuerpos no estimulan la producción de citoquinas desde linfocitos B en ausencia de CD40L, se unen a CD40 humano en presencia de suero humano al 50% con una reducción en tasa de menos de dos veces, produce la inhibición de la producción de IgM e IgG en un mamífero a una concentración de 1 mg/kg, o una combinación de los mismos.

6. Una composición farmacéutica que comprende: (i) el anticuerpo o fragmento de unión de antígenos de la reivindicación 3; y (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable; y en donde el anticuerpo o fragmento de unión de antígenos del mismo se conjuga opcionalmente con un segundo agente, en donde el segundo agente es un agente citotóxico, un vehículo PEG, una enzima o un marcador.

7. Un polinucleótido aislado que codifica una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera, en donde la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada comprende cualquiera secuencia entre SEC ID NO: 1 a 4, SEC ID NO: 27, SEC ID NO: 28, SEC ID NO: 29, SEC ID NO: 30, SEC ID NO: 32, SEC ID NO: 33, SEC ID NO: 34, SEC ID NO: 35, SEC ID NO: 37, SEC ID NO: 38, SEC ID NO: 39, SEC ID NO: 40, SEC ID NO: 42, SEC ID NO: 44, SEC ID NO: 46, SEC ID NO: 48, SEQ ID. NO. 50, SEC ID NO: 53, SEC ID NO: 57, SEC ID NO: 58, SEC ID NO: 59, SEC ID NO: 60, SEC ID NO: 61, SEC ID NO: 62, SEC ID NO: 63, SEC ID NO: 64, SEC ID NO: 65, SEC ID NO: 66, SEC ID NO: 67, SEC ID NO: 68, SEC ID NO: 69, SEC ID NO: 70, SEC ID NO: 71, SEC ID NO: 72, o SEC ID NO: 73, y la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera comprende cualquiera secuencia entre SEC ID NO: 5 a SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 26, SEC ID NO: 31, SEC ID NO: 36, SEC ID NO: 41, SEC ID NO: 43, SEC ID NO: 45, SEC ID NO: 47, SEC ID NO: 49, SEC ID NO: 50, SEC ID NO: 51, SEC ID NO: 52, SEC ID NO: 54, SEC ID NO: 55, SEC ID NO: 56, SEC ID NO: 74, SEC ID NO: 75, o SEC ID NO: 76.

8. Un uso de un anticuerpo de la reivindicación 1 para el tratamiento de, o en la fabricación de un medicamento para el bloqueo de la función de CD40 humano en un mamífero en donde el medicamento bloquea una respuesta inmune mediada por CD40 en dicho mamífero.

9. Un uso de un anticuerpo de la reivindicación 1 para tratar o mejorar, o en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o mejoramiento de la enfermedad de injerto contra huésped, una enfermedad autoinmune o inflamatoria, o un trastorno asociado con CD40 en un mamífero; y

en donde la enfermedad autoinmune o inflamatoria se selecciona a partir del grupo que consta de artritis reumatoide, esclerosis múltiple, glomerulonefritis lúpica proliferativa, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), psoriasis, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), enfermedad de Crohn y lupus eritematoso sistémico (SLE), Tiroiditis de Hashimoto, mixedema primario, tirotoxicosis/enfermedad de Graves, anemia perniciosa, gastritis atrófica autoinmune, carditis autoinmune, enfermedad de Addison, menopausia prematura, diabetes mellitus tipo 1, síndrome de Goodpasture, miastenia grave, anemia hemolítica autoinmune, leucopenia idiopática, cirrosis biliar primaria, hepatitis crónica activa (HBs Ag negativo), cirrosis criptogénica, síndrome de Sjögren, dermatomiositis, esclerodermia, enfermedad mixta del tejido conectivo, lupus eritematoso discoide y vasculitis sistémica.

10. Un uso según la reivindicación 9 en donde dicho medicamento comprende además un segundo agente terapéutico seleccionado del grupo que consta de un antagonista del TNF, un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad, un antagonista de CTLA4, un anticuerpo monoclonal del receptor anti-IL-6 y un anticuerpo monoclonal anti-CD20.

11. Un uso según la reivindicación 8 en donde dicho medicamento se fabrica para uso en una ruta de administración parenteral, intravenosa o subcutánea.

12. Un uso de un anticuerpo de la reivindicación 1 en la fabricación de un medicamento para la inhibición de la producción de anticuerpos por linfocitos B en un paciente humano y/o para inhibir el crecimiento y/o diferenciación de células que expresan el antígeno CD40 humano en un paciente humano.

13. Un uso según la reivindicación 9, en donde el medicamento se utiliza para el tratamiento de células de un trastorno asociado con el CD40 seleccionado a partir de células linfoblastoides B, células pancreáticas, células pulmonares, células de mama, células de ovario, células de colon, células de próstata, células de la piel, células de cabeza y cuello, células de

vejiga, células óseas o células renales; y en donde la unión del anticuerpo o fragmento de unión de antígenos de dicho medicamento con el CD40 inhibe el crecimiento o diferenciación de las células de la enfermedad asociada a CD40, y en donde el trastorno asociado a CD40 está opcionalmente seleccionado del grupo que consta de leucemia linfocítica crónica, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, linfoma de células T, linfoma no de Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, macroglobulinemia de Waldenstrom o sarcoma de Kaposi.

14. Un uso de un anticuerpo de la reivindicación 1 para inducir la depleción de linfocitos B periféricos o en la fabricación de un medicamento para inducir la depleción de los linfocitos B periféricos, en donde el anticuerpo o fragmento de unión de antígenos del medicamento se une específicamente a un antígeno CD40 de superficie celular humana, en donde la unión del anticuerpo o fragmento de unión de antígenos al antígeno CD40 induce la depleción de las células, y en donde el medicamento opcionalmente es para el tratamiento de un sujeto que tenga un trastorno inmune.

15. Un uso de un anticuerpo de la reivindicación 1 para el tratamiento de, o en la fabricación de un medicamento para utilizar en el tratamiento de la artritis reumatoide en un sujeto;

en donde el medicamento es para la inhibición de la diferenciación de linfocitos B y cambios de isotipos de anticuerpos en dicho sujeto, y/o el medicamento es para la inhibición de la producción de citoquinas y quimioquinas y la regulación positiva de moléculas de adhesión en las células T y los macrófagos en dicho sujeto, y/o el medicamento es para la inhibición de la activación de células dendríticas en dicho sujeto, y/o el medicamento es para la inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, metaloproteinasas de la matriz, prostaglandinas, y regulación negativa de moléculas de adhesión en las células no inmunes en dicho sujeto y

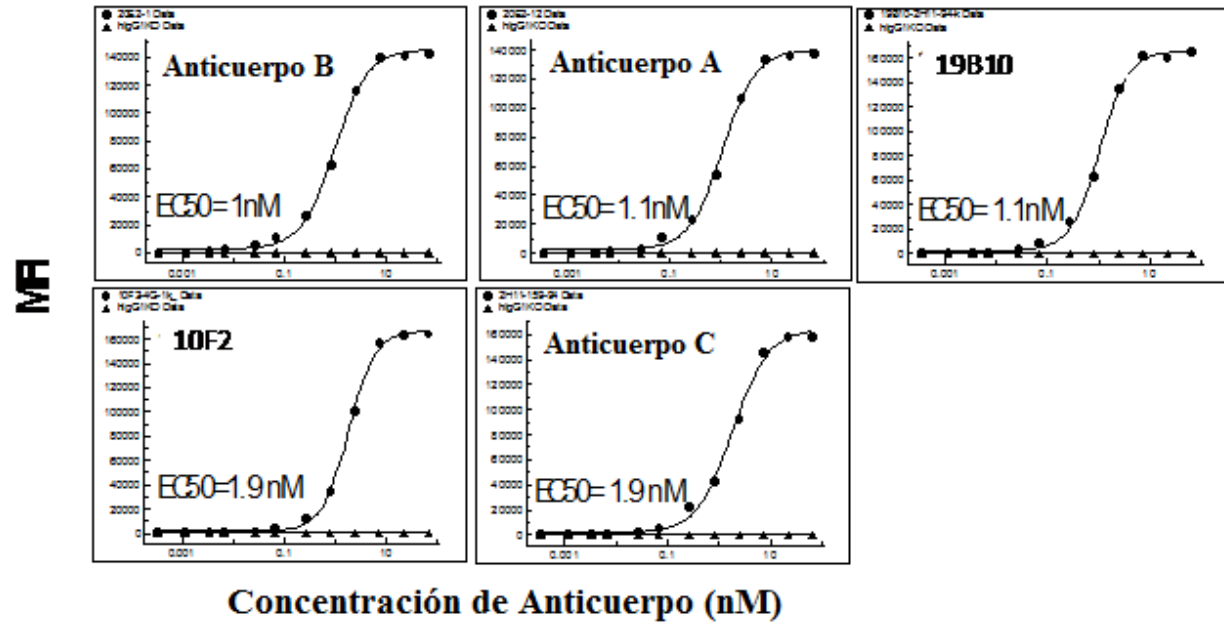
en donde el medicamento se administra opcionalmente en combinación con un régimen que comprende la administración de metotrexato y/o la administración de agentes anti-TNF.

RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

[00478] La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos anti-CD40 antagonistas humanizados y métodos terapéuticos y de diagnóstico y composiciones para el uso de los mismos.

FIGURA 1

A.



B.

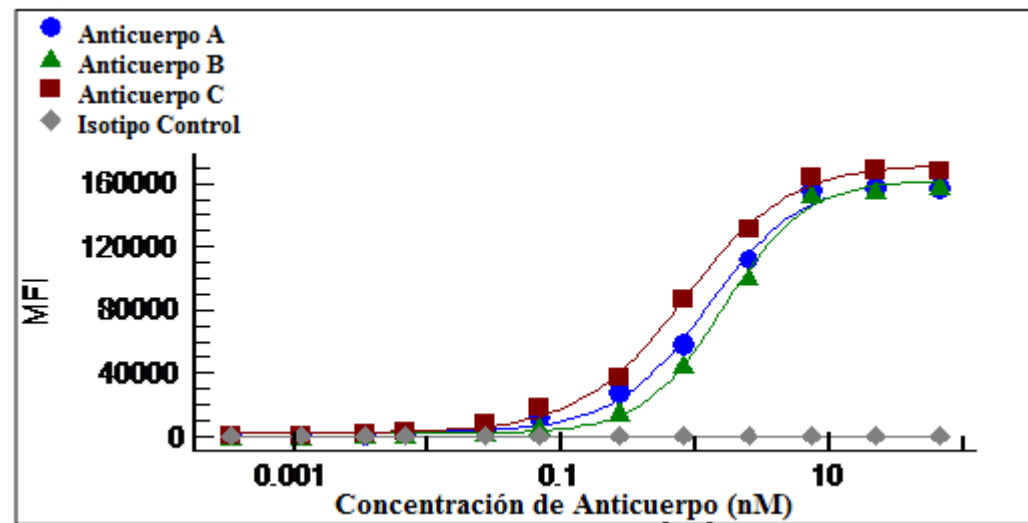


FIGURA 2

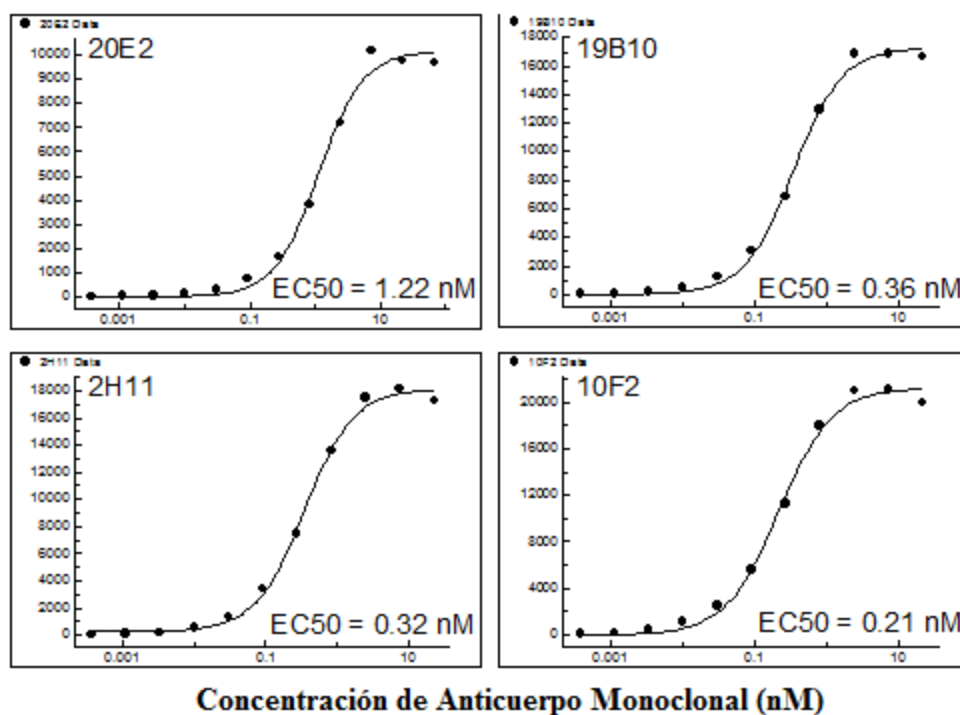
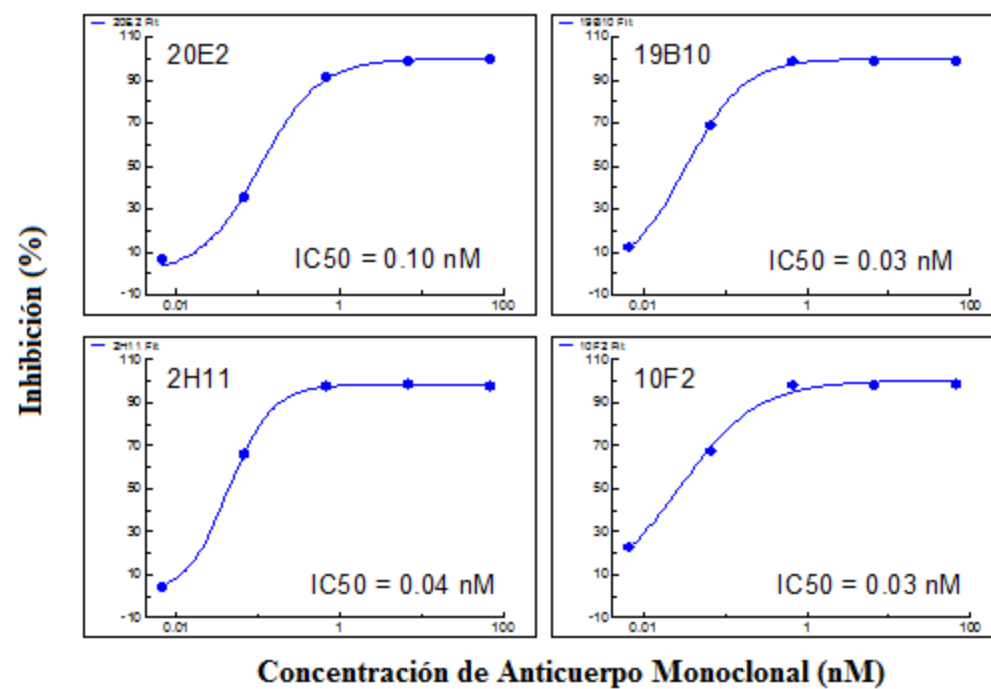


FIGURA 3

A.



B.

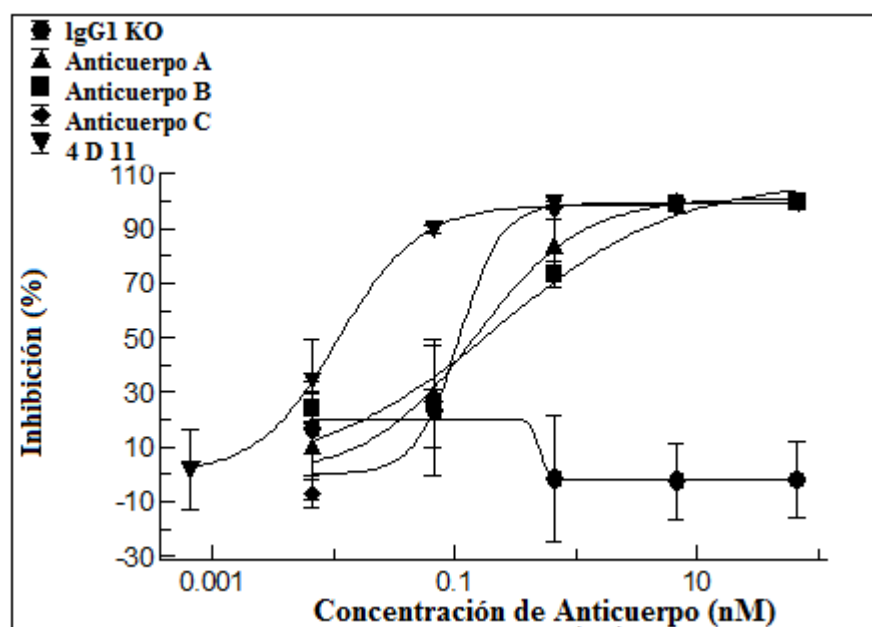


FIGURA 4

Ensayo de Proliferación de Linfocitos B Humanos			
		Antagonismo	Agonismo
Nombre del Anticuerpo	Isotipo	IC50 Media nM $\pm$ SEM (n)	SI $\pm$ SEM (n)
Anticuerpo B	hlgG1KO	0.2 $\pm$ 0.09 (n=3)	1 $\pm$ 0.3 (n=3)
Anticuerpo A	hlgG1KO	0.3 $\pm$ 0.03 (n=3)	1 $\pm$ 0.13 (n=3)
Anticuerpo C	hlgG1KO	0.1 $\pm$ 0.01 (n=3)	1 $\pm$ 0.06 (n=3)
10F2	hlgG1KO	0.8 $\pm$ 0.11 (n=3)	1 $\pm$ 0.09 (n=3)
4D11	hlgG4DM	0.02 $\pm$ 0.01 (n=3)	1 $\pm$ 0.11 (n=3)
G28.5	mlgG1	NT	7 $\pm$ 1.94 (n=3)
mu5D12	hlgG4Pro	Sin Inhibición hasta 67 nM	18 $\pm$ 3.1 (n=3)

NT= No se Probó

FIGURA 5

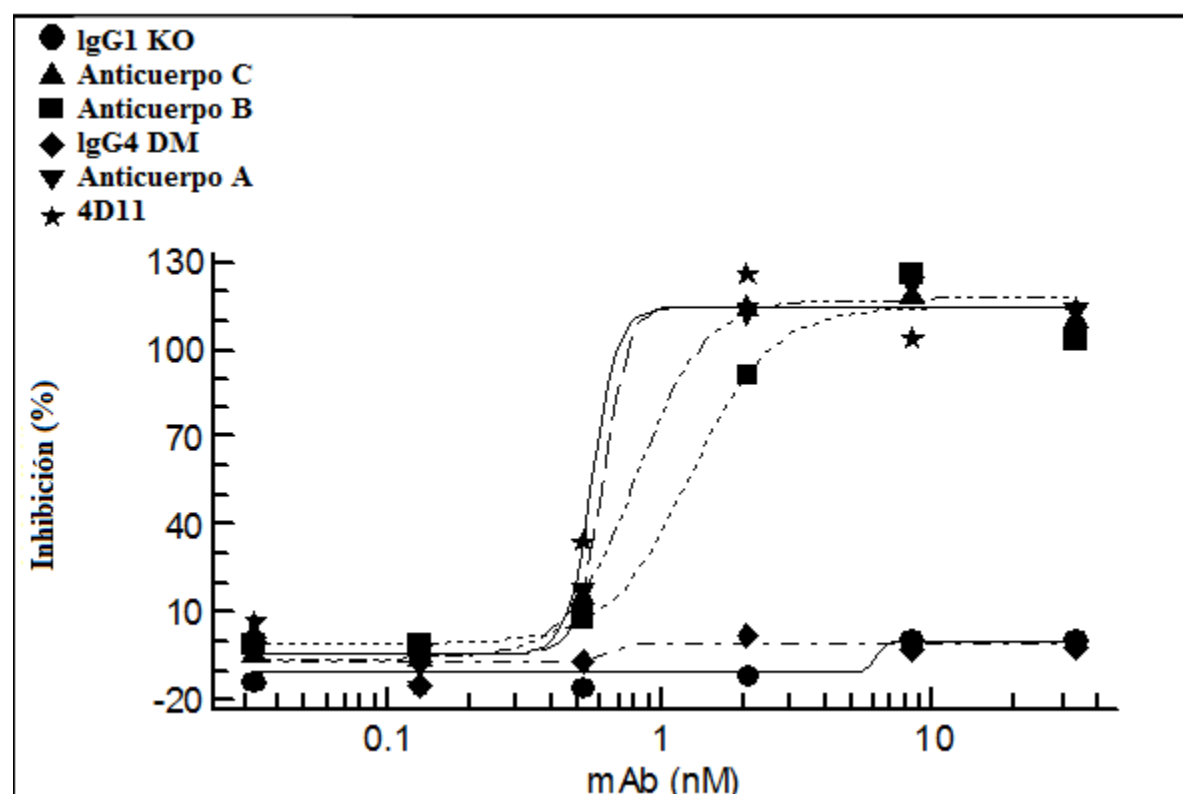


FIGURA 6

A.

mAb (isotipo)	IC50 (nM +/- SEM)		Número de Cambios
	Linfocitos B Purificados	HWB	
Anticuerpo B	0.6 +/- 0.3 (n=4)	1.3 +/- 0.7(n=4)	2.2
4D11 (hIgG4 DM)	0.03 +/- 0.01 (n=5)	0.6 +/- 0.3 (n=4)	20.0

B.

mAb (isotipo)	IC90 (nM +/- SEM)		Número de Cambios
	Linfocitos B Purificados	HWB	
Anticuerpo B	5.3 +/- 2.4 (n=4)	4.3 +/- 2.1 (n=4)	0.8
4D11 (hIgG4 DM)	0.05 +/- 0.02 (n=5)	1.3 +/- 0.64 (n=4)	26

FIGURA 7

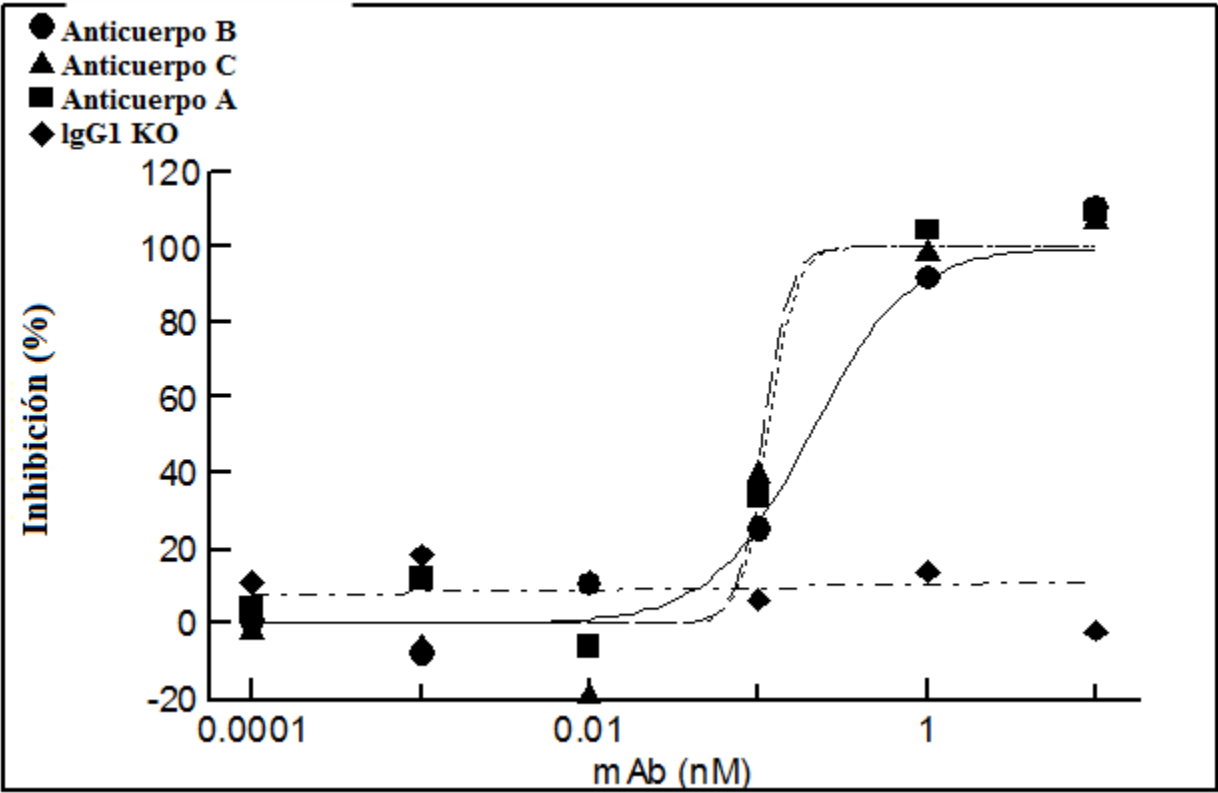


FIGURA 8

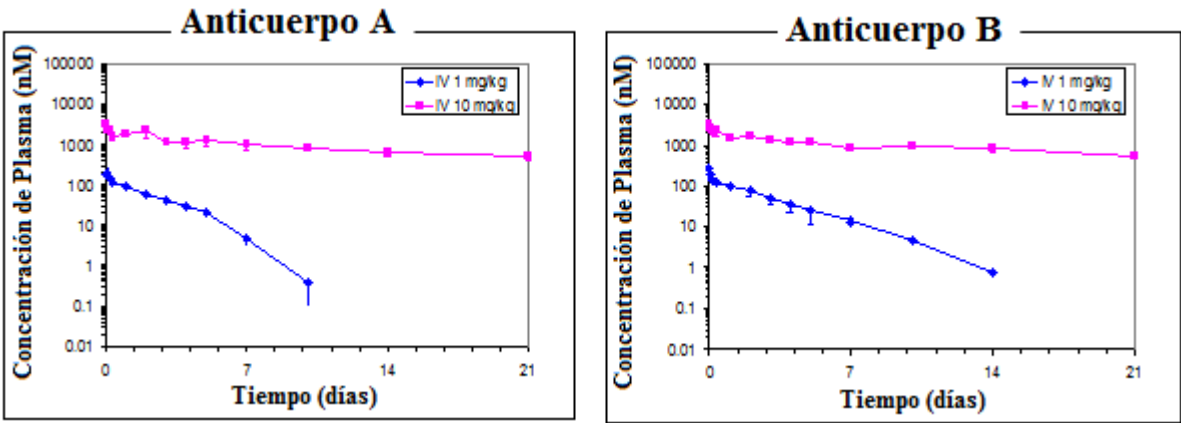


FIGURA 9

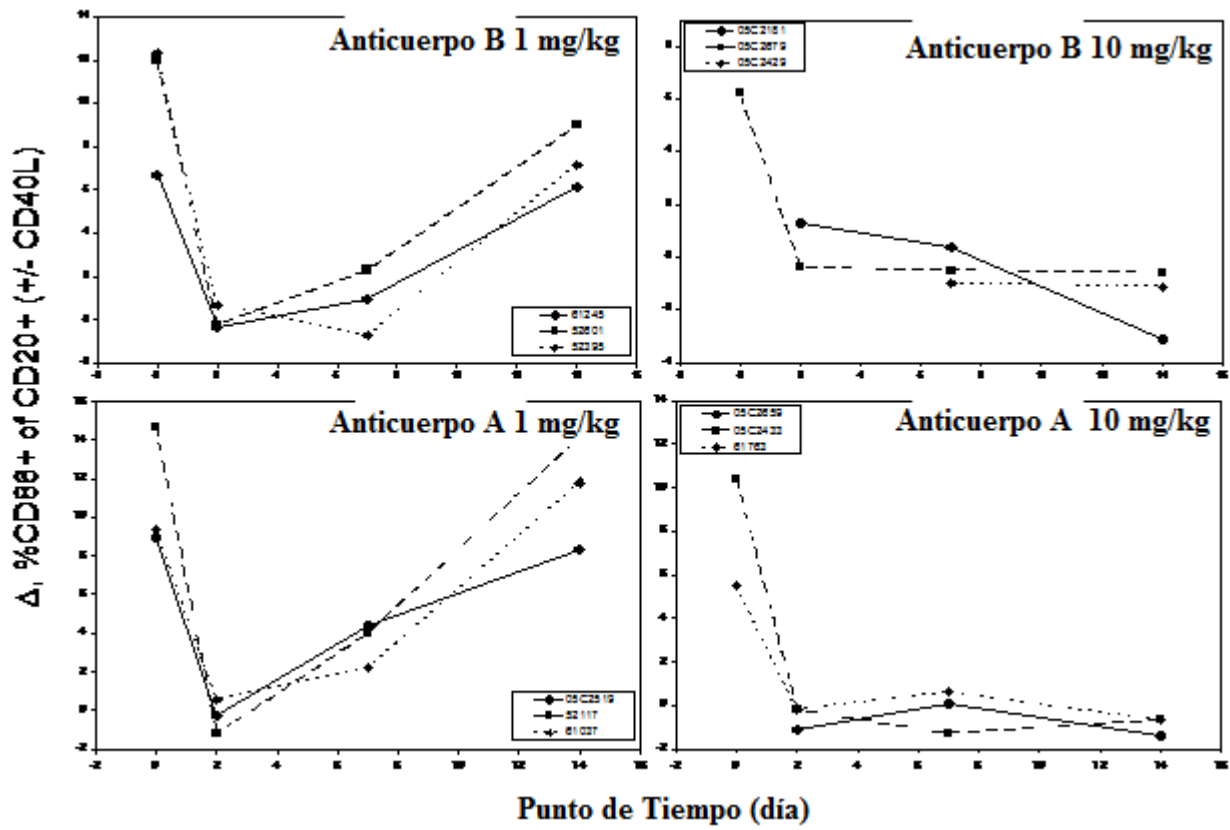
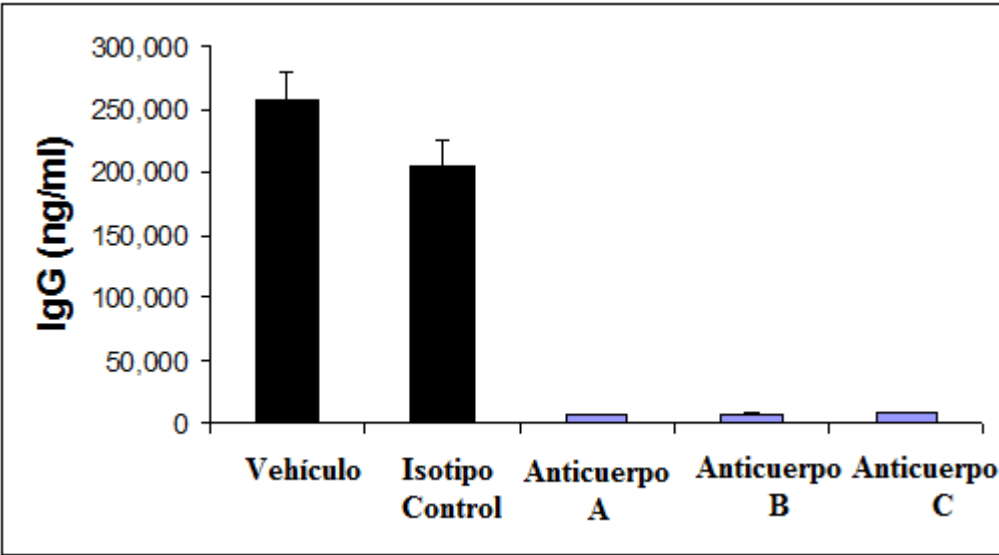


FIGURA 10

A.



B.

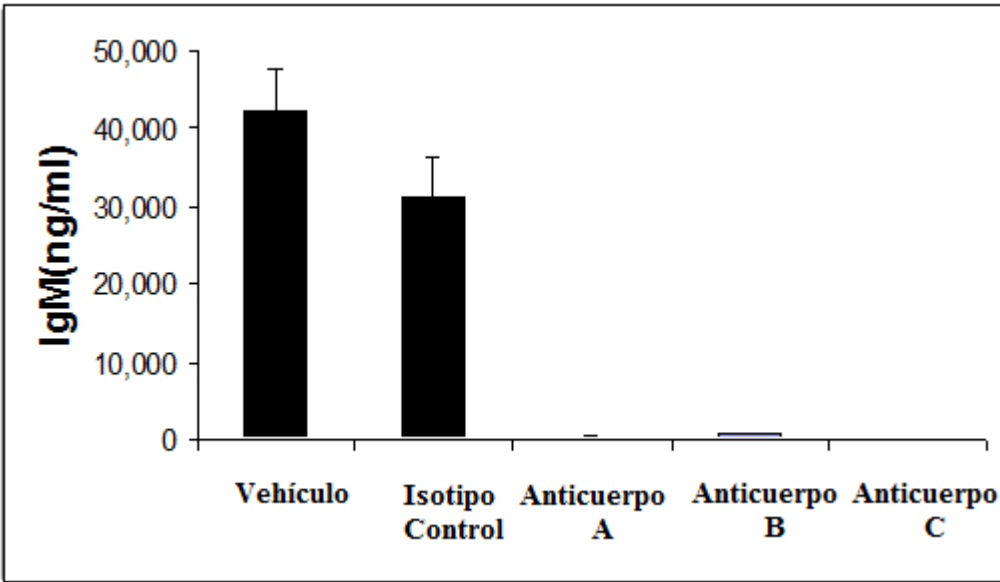


FIGURA 11

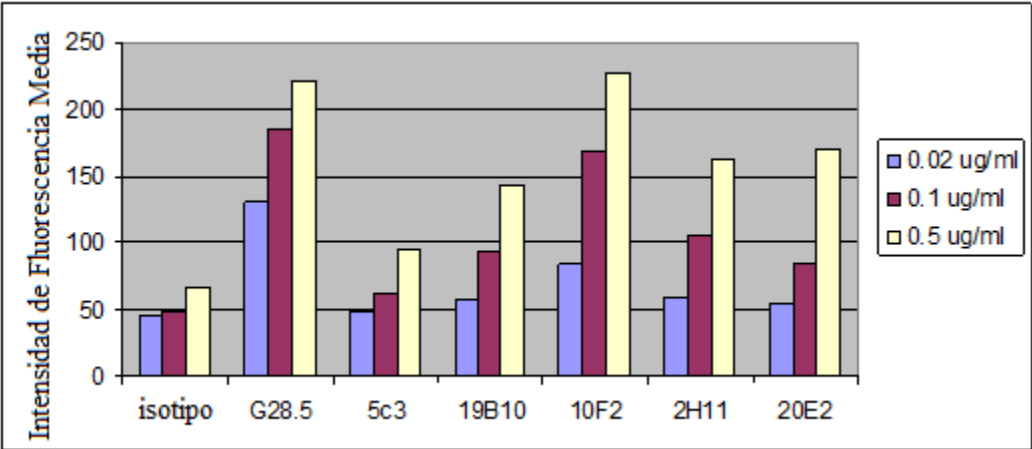
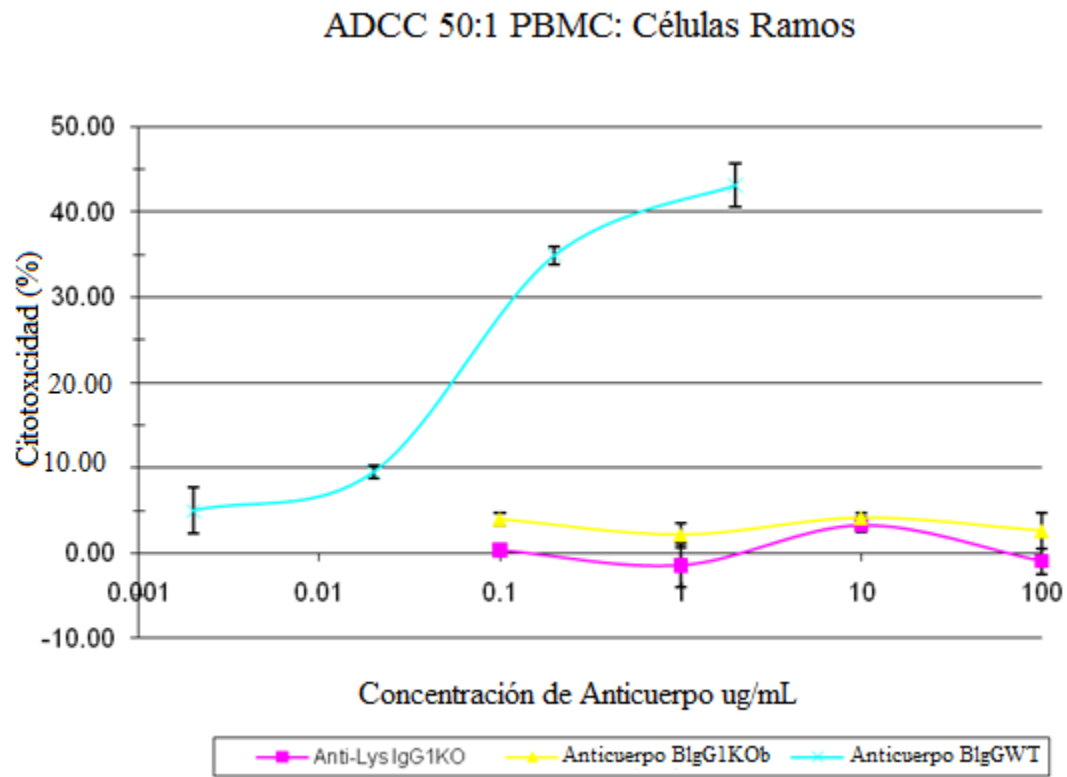


FIGURA 12

	EC50 nM (rango)	
	Anticuerpo B	4D11
Linfocitos B		
Humano (n = 6)	1.8 (1.2 a 2.3)	0.3 (0.1 a 0.3)
Cynomolgus (n = 5)	2.1 (1.4 a 2.9)	0.7 (0.6 a 0.8)
Plaquetas		
Humano (n = 5)	4.6 (2.5 a 5.8)	0.7 (0.4 a 0.9)
Cynomolgus (n = 5)	3.9 (2.7 a 6.2)	1.2 (0.9 a 1.7)

FIGURA 13



09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25
SEQUENCE LISTING

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

<120> Anti-CD40 Antibodies

<130> 02950-22687US01

<160> 78

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD40 Murine Lead VH Sequence of 2H11

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

<220>

<223> CD40 Murine Lead VH Sequence of 10F2

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 3

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD40 Murine Lead VH Sequence of 19B10

<400> 3

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 4
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CD40 Murine Lead VH Sequence of 20E2

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

<220>

<223> CD40 Murine Lead VK Sequence of 2H11

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

<210> 6

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD40 Murine Lead VK Sequence of 10F2

<400> 6

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

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

<210> 7
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CD40 Murine Lead VK Sequence of 19B10

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CD40 Murine Lead VK Sequence of 20E2

<400> 8

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

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

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

Lys

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR1 Heavy Chain of 2H11 and 19B10

<400> 9

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Val His
1 5 10

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

<220>
<223> CDR1 Heavy Chain of 10F2

<400> 10

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Ile His
1 5 10

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR1 Heavy Chain of 20E2

<400> 11

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Met His
1 5 10

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR2 Heavy Chain of 2H11

<400> 12

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

Gly

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

<220>
<223> CDR2 Heavy Chain of 10F2

<400> 13

Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

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

<220>
<223> CDR2 Heavy Chain of 19B10

<400> 14

Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Phe Ala Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

<220>

<223> CDR2 Heavy Chain of 20E2

<400> 15

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

Gly

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR3 Heavy Chain of 2H11, 10F2 and 19B10

<400> 16

Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr
1 5

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR3 Heavy Chain of 20E2

<400> 17

Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR1 Light Chain of 2H11

<400> 18

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Leu
1 5 10

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR1 Light Chain of 10F2

<400> 19

Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Ile Leu
1 5 10

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR1 Light Chain of 19B10

<400> 20

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Leu
1 5 10

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR1 Light Chain of 20E2

<400> 21

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR2 Light Chain of 2H11, 10F2 and 19B10

<400> 22

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR2 Light Chain of 20E2

<400> 23

Trp Thr Ser Thr Arg Glu Ser

1

5

<210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CDR3 Light Chain of 2H11, 10F2, and 19B10

<400> 24

Gln Gln Arg Thr Phe Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CDR3 Light Chain of 20E2

<400> 25

Gln Asn Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 26
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Light Chain of Antibody A

<400> 26

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

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

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 27
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain IgG1K0 of Antibody A

<400> 27

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

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 28
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain IgG1 of Antibody A

<400> 28

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

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

Thr Ile Ser Lys₃₄₀ Ala Lys Gly Gln Pro₃₄₅ Arg Glu Pro Gln Val₃₅₀ Tyr Thr

Leu Pro Pro₃₅₅ Ser Arg Glu Glu Met₃₆₀ Thr Lys Asn Gln Val₃₆₅ Ser Leu Thr

Cys Leu Val₃₇₀ Lys Gly Phe Tyr₃₇₅ Pro Ser Asp Ile Ala Val₃₈₀ Glu Trp Glu

Ser Asn Gly Gln Pro₃₉₀ Glu Asn Asn Tyr Lys Thr₃₉₅ Thr Pro Pro Val₄₀₀ Leu

Asp Ser Asp Gly Ser₄₀₅ Phe Phe Leu Tyr Ser₄₁₀ Lys Leu Thr Val₄₁₅ Asp Lys

Ser Arg Trp Gln₄₂₀ Gln Gly Asn Val₄₂₅ Phe Ser Cys Ser Val₄₃₀ Met His Glu

Ala Leu His₄₃₅ Asn His Tyr Thr Gln₄₄₀ Lys Ser Leu Ser₄₄₅ Leu Ser Pro Gly

Lys

<210> 29
<211> 446
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain IgG4DM of Antibody A

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val₅ Glu Ser Gly Gly Gly₁₀ Leu Val Lys Pro Gly₁₅ Gly

Ser Leu Arg Leu₂₀ Ser Cys Ala Ala Ser₂₅ Gly Phe Thr Phe Ser₃₀ Asp Tyr

Gly Met His₃₅ Trp Val Arg Gln Ala₄₀ Pro Gly Lys Gly Leu₄₅ Glu Trp Val

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Asn Arg Ile Ile Tyr Tyr₆₀ Ala Asp Thr Val

Lys Gly Arg Phe Thr Ile₇₀ Ser Arg Asp Asn Ala₇₅ Lys Asn Ser Leu Tyr₈₀

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<223> Heavy Chain IgG1K0b of Antibody A

<400> 30

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

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

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 31
<211> 220
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Light Chain of Antibody B

<400> 31

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

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

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 32
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain IgG1K0 of Antibody B

<400> 32

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

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 33

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy Chain IgG1 of Antibody B

<400> 33

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

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 34

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy Chain IgG4DM of Antibody B

<400> 34

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

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
130 135 140

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

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

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

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

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

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

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

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

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

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

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

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

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

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

<210> 35

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy Chain IgG1K0b of Antibody B

<400> 35

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

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

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 36
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Light Chain of Antibody C

<400> 36

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

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

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 37
<211> 448
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain IgG1k0 of Antibody C

<400> 37

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

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

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

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

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

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

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

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

<210> 38
<211> 448
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain IgG1 of Antibody C
<400> 38

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

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

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

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

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

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
Página 31

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

100

105

110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

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

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

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

<210> 39
<211> 445
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain IgG4DM of Antibody C

<400> 39

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
Página 33

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

115

120

125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

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

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

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

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

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

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

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

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
260 265 270

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

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

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

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

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

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

<210> 40
<211> 448
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy Chain IgG1K0b of Antibody C
<400> 40

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
Página 35

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

130

135

140

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

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

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

<220>
<223> variable Light Chain in both BI 655034 and BI 655035
<400> 41

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

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

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

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

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

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

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

Lys

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

<220>

<223> variable Heavy Chain in both BI 655034 and BI 655035

<400> 42

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 43

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> variable Light Chain in both BI 655036 and Antibody A

<400> 43

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

Lys

<210> 44
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> variable Heavy Chain in both BI 655036 and Antibody A
<400> 44

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 45
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

<220>

<223> variable Light Chain in both BI 655038 and BI 655039

<400> 45

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 46

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> variable Heavy Chain in both BI 655038 and BI 655039

<400> 46

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 47

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> variable Light Chain in both BI 655040 and BI 655041

<400> 47

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 48

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

<220>

<223> variable Heavy Chain in both BI 655040 and BI 655041

<400> 48

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 49

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> variable Light Chain in both BI 655042 and BI 655043

<400> 49

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

Lys

<210> 50
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> variable Light Chain in both BI 655042 and BI 655043
<400> 50

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 51
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

<220>

<223> variable Light Chain in both BI 655044 and BI 655045

<400> 51

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 52

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> variable Light Chain in both BI 655046 and Antibody B

<400> 52

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

Lys

<210> 53

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable Heavy Chain in each of BI 655044, BI 655045, BI 655046
and Antibody B

<400> 53

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 54

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

<220>

<223> variable Light Chain in BI 655052

<400> 54

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

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

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

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

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

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

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

<210> 55

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> variable Light Chain in each of BI 655053, BI 655055, BI 655057,
BI 655059 and BI 655061

<400> 55

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

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

<210> 56
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> variable Light Chain in each of BI 655054, Antibody B, BI 655058,
BI 655060 and BI 655062

<400> 56

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

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

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

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

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

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

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

<210> 57
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> variable Heavy Chain in each of BI 655052, BI 655053 and BI
655054

<400> 57

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 58
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> variable Heavy Chain in both BI 655055 and Antibody C
<400> 58

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

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

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 59
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> variable Heavy Chain in both BI 655057 and BI 655058

<400> 59

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 60
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> variable Heavy Chain in both BI 655059 and BI 655060

<400> 60

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 61
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> variable Heavy Chain in both BI 655061 and BI 655062
<400> 61

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

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

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 62
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Variable Heavy Sequence Version 1 from Antibody 19B10-Hum

<400> 62

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 63
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Variable Heavy Sequence Version 2 from Antibody 19B10-Hum

<400> 63

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 64

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> variable Heavy Sequence Version 3 from Antibody 19B10-Hum

<400> 64

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

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

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 65
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Variable Heavy Sequence Version 4 from Antibody 19B10-Hum
<400> 65

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 66
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Variable Heavy Sequence Version 5 from Antibody 19B10-Hum
<400> 66

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 67
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> variable Heavy Sequence Version 1 from Antibody 10F2Hum
<400> 67

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

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

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 68
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Variable Heavy Sequence Version 2 from Antibody 10F2Hum
<400> 68

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 69
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Variable Heavy Sequence Version 3 from Antibody 10F2Hum
<400> 69

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 70
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> variable Heavy Sequence Version 4 from Antibody 10F2Hum
<400> 70

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

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

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 71
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Variable Heavy Sequence Version 5 from Antibody 10F2Hum
<400> 71

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 72
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Variable Heavy Sequence Version 6 from Antibody 10F2Hum
<400> 72

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 73
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> variable Heavy Sequence Version 7 from Antibody 10F2Hum
<400> 73

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

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

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

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

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 74
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Variable Light Sequence Version 1 from Antibody 10F2Hum
<400> 74

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

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

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

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

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

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

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

<210> 75
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Variable Light Sequence Version 2 from Antibody 10F2Hum
<400> 75

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

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

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

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

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

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

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

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

<210> 76

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> variable Light Sequence Version 3 from Antibody 10F2Hum

<400> 76

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

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

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

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

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

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

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

<210> 77

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

09-0529-PCT_Sequence_Listing_ST25

<220>
 <223> Heavy Chain CDR3 for 2H11, 10F2 and 19B10

<400> 77

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr
 1 5 10

<210> 78
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Heavy Chain CDR3 for 20E2

<400> 78

Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

MORRIS, Michael P.
Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.
900 Ridgebury Road
P.O. Box 368
Ridgefield, CT 06877-0368
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 11 September 2012 (11.09.2012)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 09-0529-PCT	
International application No. PCT/US2011/030427	International filing date (day/month/year) 30 March 2011 (30.03.2011)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☒ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address LITZENBURGER, Tobias Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc. 900 Ridgebury Road P.O. Box 368 Ridgefield, Connecticut 06877-0368 United States of America	State of Nationality DE	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☐ the person	☐ the name	☒ the address
☐ the nationality		
☐ the residence		
Name and Address LITZENBURGER, Tobias Boehringer Ingelheim GmbH Corporate Patents Binger Strasse 173 55216 Ingelheim Am Rhein Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority	
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned	
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned	
	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Gaspais Stephane e-mail pt05.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 05
Facsimile No. +41 22 338 89 75	

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 09 - 0529 - PCT	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2011/030427	International filing date (<i>day/month/year</i>) 30/03/2011	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 31/03/2010
Applicant BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☒ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2011/030427

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1, 5-15(all partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2011/030427

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 A61K39/395 C12N15/13 A61P27/00 A61P37/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/124299 A2 (NOVARTIS AG [CH]; XOMA TECHNOLOGY LTD [US]; LU XIAOFENG [US]; CHEN BAO) 1 November 2007 (2007-11-01) page 45, line 31 - page 47, line 16; claims 1,43	1,5-15
X	US 2003/165499 A1 (CHU KETING [US] ET AL) 4 September 2003 (2003-09-04) claims 1,6	1,5-15
X	WO 2007/129895 A2 (PANGENETICS B V [NL]; DEN HARTOG MARCEL THEODORUS [NL]; VAN NEERVEN RU) 15 November 2007 (2007-11-15) the whole document	1,5-15
X	US 2004/120948 A1 (MIKAYAMA TOSHIFUMI [JP] ET AL) 24 June 2004 (2004-06-24) example 3; table 2	1,5-15
	-/-	



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 July 2011

Date of mailing of the international search report

29/09/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Weikl, Martina

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/030427

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ALMAGRO JUAN C ET AL: "Humanization of antibodies", FRONTIERS IN BIOSCIENCE (LANDMARK EDITION), FRONTIERS IN BIOSCIENCE, US, vol. 13, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 1619-1633, XP002614477, ISSN: 1093-4715 the whole document -----	1,5-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/030427

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007124299	A2	01-11-2007	AR 060487 A1 18-06-2008
		AU 2007240507 A1 01-11-2007	
		BR PI0710826 A2 23-08-2011	
		CA 2649907 A1 01-11-2007	
		CN 101426817 A 06-05-2009	
		CR 10379 A 07-01-2009	
		EA 200802135 A1 28-04-2009	
		EC SP088903 A 27-02-2009	
		EP 2019841 A2 04-02-2009	
		JP 2009534401 A 24-09-2009	
		KR 20090009204 A 22-01-2009	
		MA 30470 B1 01-06-2009	
		SM AP200800064 A 26-11-2008	
		SV 2008003071 A 01-02-2010	
		US 2009304706 A1 10-12-2009	
US 2003165499	A1	04-09-2003	US 2011091472 A1 21-04-2011
WO 2007129895	A2	15-11-2007	AR 060998 A1 30-07-2008
		AU 2007249031 A1 15-11-2007	
		CA 2651565 A1 15-11-2007	
		CN 101490086 A 22-07-2009	
		EP 1854810 A1 14-11-2007	
		EP 2019840 A2 04-02-2009	
		JP 2009536522 A 15-10-2009	
		KR 20090029203 A 20-03-2009	
		RU 2008148303 A 20-06-2010	
		US 2008085531 A1 10-04-2008	
		ZA 200810381 A 31-03-2010	
US 2004120948	A1	24-06-2004	AT 374214 T 15-10-2007
		AU 2009200017 A1 05-02-2009	
		CA 2658221 A1 07-11-2002	
		CN 101508734 A 19-08-2009	
		DK 1391464 T3 14-01-2008	
		EP 2009027 A1 31-12-2008	
		EP 2011802 A2 07-01-2009	
		PT 1391464 E 15-11-2007	
		US 2009123466 A1 14-05-2009	
		US 2010234578 A1 16-09-2010	

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 5-15(all partially)

Claims relating to humanized antagonistic CD-40 antibodies with CDR regions derived from murine lead antibody 2H11, i.e. antibodies having the heavy chain CDR regions represented by SEQ ID Nos 9, 12 and 16 and having the light chain CDR regions represented by SEQ ID Nos 18, 22 and 24 or antibodies having the light chain sequence represented by SEQ ID No 36 and one of the heavy chain sequences represented by SEQ ID Nos 37-40 (Antibody C); nucleic acids encoding such antibodies and therapeutic methods employing such antibodies

2. claims: 2(completely); 1, 7-15(partially)

Claims relating to humanized antagonistic CD-40 antibodies with CDR regions derived from murine lead antibody 10F2, i.e. antibodies having the heavy chain CDR regions represented by SEQ ID Nos 10, 13 and 16 and having the light chain CDR regions represented by SEQ ID Nos 19, 22 and 24; nucleic acids encoding such antibodies and therapeutic methods employing such antibodies

3. claims: 3(completely); 1, 7-15(partially)

Claims relating to humanized antagonistic CD-40 antibodies with CDR regions derived from murine lead antibody 19B10, i.e. antibodies having the heavy chain CDR regions represented by SEQ ID Nos 9, 14 and 16 and having the light chain CDR regions represented by SEQ ID Nos 20, 22 and 24; nucleic acids encoding such antibodies and therapeutic methods employing such antibodies

4. claims: 4(completely); 1, 5-15(partially)

Claims relating to humanized antagonistic CD-40 antibodies with CDR regions derived from murine lead antibody 20E2, i.e. antibodies having the heavy chain CDR regions represented by SEQ ID Nos 11, 15 and 17 and having the light chain CDR regions represented by SEQ ID Nos 21, 23 and 25 or antibodies having the light chain sequence represented by SEQ ID No 26 and one of the heavy chain sequences represented by SEQ ID Nos 27-30 (Antibody A) or antibodies having the light chain sequence represented by SEQ ID No 31 and one of the heavy chain sequences represented by SEQ ID Nos 32-35 (Antibody B); nucleic acids encoding such antibodies and therapeutic methods employing such antibodies
