

## **Anticuerpos agonistas que se unen específicamente a cd40 humana y métodos de uso**

### **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos agonistas que se unen específicamente a CD40 humana, polinucleótidos que codifican los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, y a los métodos de preparación y los usos de los anteriores.

### **Antecedentes de la invención**

La molécula CD40 de la superficie celular es un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR, por sus siglas en inglés) y un regulador clave en las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. CD40 se expresa en células que presentan antígeno humano, particularmente, células B, células dendríticas y macrófagos, así como en fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliales y células epiteliales. CD40 también se expresa en una amplia variedad de células tumorales que incluyen todos los linfomas B, 30-70 % de tumores sólidos, melanomas y carcinomas.

El ligando natural de CD40, designado CD154 o CD40L, se expresa principalmente en linfocitos T y plaquetas. La interacción de CD40 con CD40L en células T induce respuestas inmunitarias humorales y mediadas por células. CD40 regula este par ligando-receptor para activar

células B y otras células que presentan antígenos (APC, por sus siglas en inglés) que incluyen células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés), e impulsa la activación de células T. Por ejemplo, la activación de CD40 en células B induce la proliferación de células B, la hipermutación somática, la diferenciación en células secretoras de anticuerpos y la conmutación de isotipos en centros germinales de órganos linfoides secundarios. Los estudios *in vitro* han mostrado efectos directos de la activación de CD40 en la producción de citocina (p. ej., IL 6, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ ), la expresión de moléculas de adhesión y receptores coestimulantes (p. ej., ICAM, CD23, CD80 y CD86) y una mayor expresión de MHC clase I, MHC clase II y transportador TAP por los linfocitos B.

Los anticuerpos CD40 pueden generar sus efectos antitumorales por diversos mecanismos, que incluyen la activación de células que presentan antígenos que producen una actividad aumentada de linfocitos T citotóxicos específicos del tumor y células asesinas naturales (células NK), o apoptosis de células tumorales mediada por anticuerpos directos o citotoxicidad celular de tumores positivos a CD40. Sin embargo, la administración sistémica de anticuerpos anti-CD40 también se ha asociado con efectos secundarios adversos, tal como un síndrome de liberación de citocina.

Por lo tanto, existe la necesidad de anticuerpos anti-CD40 mejorados para la terapia contra el cáncer y la mejora de la respuesta inmunitaria.

**Breve descripción de la invención**

La invención proporciona un anticuerpo agonista aislado que se une específicamente a CD40 humana de la sec. con núm. de ident.: 75.

La invención proporciona, además, un anticuerpo agonista aislado que se une específicamente a CD40 humana, en donde el anticuerpo requiere reticulación para su actividad agonista.

La invención proporciona, además, un anticuerpo agonista aislado que se une específicamente a CD40 humana que comprende ciertas secuencias de VH, VL, HCDR, LCDR, cadena pesada o cadena ligera como se describe en la presente.

La invención proporciona, además, una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona, además, un polinucleótido que codifica la VH del anticuerpo, la VL del anticuerpo, la VH del anticuerpo y la VL del anticuerpo, la cadena pesada del anticuerpo, la cadena ligera del anticuerpo o la cadena pesada del anticuerpo y la cadena ligera del anticuerpo de la invención.

La invención proporciona, además, un vector que comprende el polinucleótido de la invención.

La invención proporciona, además, una célula huésped que comprende el vector de la invención.

La invención proporciona, además, un método para producir el anticuerpo de la invención, que comprende cultivar la célula huésped de la invención en condiciones en que el anticuerpo se expresa, y recuperar el anticuerpo producido por la célula huésped.

La invención proporciona, además, un método para tratar un cáncer en un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo aislado de la invención o la composición farmacéutica de la invención al sujeto con necesidad de este durante un tiempo suficiente para tratar el cáncer.

La invención proporciona, además, un método para mejorar una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo aislado de la invención o la composición farmacéutica de la invención al sujeto con necesidad de este durante un tiempo suficiente para mejorar la respuesta inmunitaria.

La invención proporciona, además, un anticuerpo antiidiotípico que se une específicamente al anticuerpo de la invención.

La invención proporciona, además, un estuche que comprende el anticuerpo de la invención.

### **Breve descripción de las figuras**

La **Figura 1A** muestra que los anticuerpos que se unen específicamente a CD40 humana activan células B en una forma dependiente de la reticulación. La activación de células B se midió como

una mayor expresión de superficie de CD23 en ausencia de un reticulador. M9 se refiere al anticuerpo C40M9, etc. Control: CP-870,893.

La **Figura 1B** muestra que los anticuerpos que se unen específicamente a CD40 humana activan células B en una forma dependiente de la reticulación. La activación de células B se midió como una mayor expresión de superficie de CD23 en presencia de un reticulador. M9 se refiere al anticuerpo C40M9, etc. Control: CP-870,893.

La **Figura 1C** muestra que los anticuerpos que se unen específicamente a CD40 humana activan células B en una forma dependiente de la reticulación. La activación de células B se midió como una mayor expresión de superficie de HLA-DR en ausencia de un reticulador. M9 se refiere al anticuerpo C40M9, etc. Control: CP-870,893.

La **Figura 1D** muestra que los anticuerpos que se unen específicamente a CD40 humana activan células B en una forma dependiente de la reticulación. La activación de células B se midió como una mayor expresión de superficie de HLA-DR en presencia de un reticulador. M9 se refiere al anticuerpo C40M9, etc. Control: CP-870,893.

La **Figura 2A** muestra que los anticuerpos que se unen específicamente a CD40 humana activan células dendríticas en una forma dependiente de la reticulación. La activación de DC se midió como una mayor expresión de superficie de CD83 en ausencia de un reticulador. M9 se refiere al anticuerpo C40M9, etc. Control: CP-870,893.

La **Figura 2B** muestra que los anticuerpos que se unen específicamente a CD40 humana activan células dendríticas (DC) en una forma dependiente de la reticulación. La activación de DC se midió como una mayor expresión de superficie de CD83 en presencia de un reticulador. M9 se refiere al anticuerpo C40M9, etc. Control: CP-870,893.

La **Figura 2C** muestra que los anticuerpos que se unen específicamente a CD40 humana activan células dendríticas (DC) en una forma dependiente de la reticulación. La activación de DC se midió como una mayor expresión de superficie de HLA-DR en ausencia de un reticulador. M9 se refiere al anticuerpo C40M9, etc. Control: CP-870,893.

La **Figura 2D** muestra que los anticuerpos que se unen específicamente a CD40 humana activan células dendríticas (DC) en una forma dependiente de la reticulación. La activación de DC se midió como una mayor expresión de superficie de HLA-DR en presencia de un reticulador. M9 se refiere al anticuerpo C40M9, etc. Control: CP-870,893.

La **Figura 3** muestra la alineación de aminoácidos de los residuos 1-98 de VH de C40M9 (C40H43; secuencia con núm. de ident.: 60) y la línea germinal humana IGHV4-39\*01 (sec. con núm. de ident.: 73; que se muestra como IGHV4-39 en la Figura). Los aminoácidos de HCDR1 y HCDR2 están subrayados. Los marcos de C40M9 e IGHV4-39\*01 diferían en 3 aminoácidos.

La **Figura 4** muestra la alineación de aminoácidos de los residuos 1-94 de VL de C40M18 (C40L64; secuencia con núm. de ident.: 66) y la línea germinal humana IGLV3-1 (sec. con núm. de ident.: 86). Las secuencias de

aminoácidos de LCDR1 y LCDR2 están subrayadas. El marco de C40M18 difiere en 2 aminoácidos del de IGLV3-1.

La **Figura 5** muestra la estructura cristalina de C40M126 en complejo con CD40.

La **Figura 6** muestra el dibujo de los residuos del epítipo y el parátipo de C40B126. La numeración de residuos de CD40 es de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 75. La numeración de residuos de VH y VL de C40M126 es de acuerdo con las sec. con núms. de ident.: 62 y 69, respectivamente.

La **Figura 7** muestra que C40M126 es más potente en la activación de células dendríticas en comparación con el anticuerpo de control CP-870,893 y que C40M9 tiene un agonismo mínimo independiente de la reticulación. La activación de DC se midió como una mayor expresión de superficie de HLA-DR en ausencia de un reticulador. M9 se refiere al anticuerpo C40M9 y M126 se refiere al anticuerpo C40M126. Control: CP-870,893.

La **Figura 8** muestra una disminución transitoria en los recuentos plaquetarios en animales a los que se dosificó 10 mg/ml del anticuerpo de control CP-870,893, mientras que la dosificación con C40M9 o C40M126 no produjo una reducción en los recuentos plaquetarios. Se muestran los resultados de dos animales individuales por grupo.

La **Figura 9** muestra una mayor producción de IL-6 (pg/ml) en animales tratados con 10 mg/ml del anticuerpo de control CP-870,893 cuando se compara con los animales a los que se dosificó C40M9 o C40M126. Se muestran los resultados de dos animales individuales por grupo.

**Descripción detallada de la invención**

Todas las publicaciones, que incluyen, pero no se limitan a, las patentes y solicitudes de patentes, citadas en esta descripción se incorporan en este documento como referencia como si se describieran completamente.

Se debe entender que la terminología usada en la presente descripción tiene el propósito de describir modalidades particulares únicamente y no pretende ser limitante. A menos que se definan de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado como lo entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la invención.

Como se usa en la presente descripción, las formas singulares “un”, “una” y “el” y “la” incluyen la referencia en plural a menos que el contexto determine claramente de cualquier otra manera.

Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente descripción puede usarse en la práctica para la prueba de la presente invención, en la presente descripción se describen materiales y métodos ilustrativos.

“Unión específica” o “se une específicamente” o “se une” se refieren al anticuerpo que se une a CD40 humana con mayor afinidad que a antígenos no relacionados. Típicamente, el anticuerpo se une a CD40 humana con una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $1 \times 10^{-8}$  M o menor, por ejemplo,  $1 \times 10^{-9}$  M o menor,  $1 \times 10^{-10}$  M o menor,  $1 \times 10^{-11}$  M o menor, o  $1 \times 10^{-12}$  M o menor, típicamente, con una  $K_D$  que es al menos cien veces menor

que su  $K_D$  para la unión a un antígeno no relacionado (p. ej., BSA, caseína). La constante de disociación puede medirse mediante el uso de procedimientos estándar. Sin embargo, los anticuerpos que se unen específicamente a CD40 humana pueden tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, con el mismo antígeno de otras especies (homólogos), tales como un ser humano o un mono, por ejemplo, *Macaca fascicularis* (cynomolgus, cyno), *Pan troglodytes* (chimpancé, chimp) o *Callithrix jacchus* (tití común, tití). Si bien un anticuerpo monoespecífico se une específicamente a un antígeno o un epítipo, un anticuerpo biespecífico se une específicamente a dos antígenos distintos o dos epítopos distintos.

“Anticuerpos” se entiende en un sentido amplio e incluye moléculas de inmunoglobulina que incluyen anticuerpos monoclonales que incluyen anticuerpos monoclonales murinos, humanos, humanizados y quiméricos, fragmentos de unión a antígenos, anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos, anticuerpos diméricos, tetraméricos o multiméricos, anticuerpos de cadena simple, anticuerpos de dominio y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de unión al antígeno de la especificidad requerida. Los “anticuerpos en toda su extensión” comprenden dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, así como multímeros de estas (por ejemplo, IgM). Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región constante de cadena pesada (que comprende los dominios CH1, CH2 bisagra y CH3).

Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (VL) y una región constante de cadena ligera (CL). Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones de marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro segmentos FR, ordenados de extremo amino terminal a extremo carboxilo terminal en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.

Las “regiones determinantes de complementariedad (CDR)” son “sitios de unión al antígeno” en un anticuerpo. Las CDR pueden definirse mediante el uso de varios términos: (i) Las regiones determinantes de complementariedad (CDR), tres en la VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) y tres en la VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3) se basan en la variabilidad de la secuencia (Wu y Kabat, J Exp Med 132:211-50, 1970; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ta ed. Servicio de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bethesda, Md., 1991). (ii) “Regiones hipervariables”, “HVR”, o “HV”, tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3), se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en estructura, tal como lo definen Chothia y Lesk (Chothia y Lesk, Mol Biol 196:901-17, 1987). The International ImMunoGeneTics (IMGT) database ([http://www\\_imgt\\_org](http://www.imgt.org)) presenta una numeración estandarizada y definición de sitios de unión a antígenos. La correspondencia entre las delineaciones de CDR, HV e IMGT se describe en Lefranc *et al.*, Dev Comparat Immunol 27:55-77, 2003. Los términos “CDR”,

“HCDR1”, “HCDR2”, “HCDR3”, “LCDR1”, “LCDR2” y “LCDR3”, como se usan en la presente descripción, incluyen las CDR definidas por cualquiera de los métodos descritos anteriormente, Kabat, Chothia o IMGT, a menos que se indique explícitamente de cualquier otra manera en la especificación.

Las inmunoglobulinas pueden asignarse a cinco clases principales, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de la cadena pesada. La IgA e IgG se subclasifican adicionalmente como los isotipos IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> y IgG<sub>4</sub>. Las cadenas ligeras del anticuerpo de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos muy distintos, denominados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

“Fragmento de unión al antígeno” se refiere a una porción de una molécula de inmunoglobulina que retiene las propiedades de unión al antígeno del anticuerpo parental en toda su extensión. Los fragmentos de unión al antígeno ilustrativos son como regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR, por sus siglas en inglés) 1, 2 y/o 3, regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR, por sus siglas en inglés) 1, 2 y/o 3, una región variable de cadena pesada (VH) o una región variable de cadena ligera (VL), fragmentos Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fd y Fv, así como también anticuerpos de dominio (dAb, por sus siglas en inglés) que consisten en un dominio VH o un dominio VL. Los dominios VH y VL pueden unirse entre sí a través de un enlazador sintético para formar varios tipos de diseños de anticuerpos de cadena simple, en donde los dominios VH/VL se aparean

intramolecularmente, o intermolecularmente en los casos en que los dominios VH y VL se expresan por cadenas separadas, para formar un sitio de unión al antígeno monovalente, tal como un Fv de cadena simple (scFv) o un diacuerpo; descrito, por ejemplo, en la publicación de patente internacional núm. WO1998/44001, la publicación de patente internacional núm. WO1988/01649; la publicación de la patente internacional núm. WO1994/13804; la publicación de la patente internacional núm. WO1992/01047.

“Anticuerpo monoclonal” se refiere a una población de anticuerpos con composición de aminoácidos única en cada cadena pesada y cada cadena ligera, excepto por posibles alteraciones bien conocidas tales como la eliminación de la lisina del extremo C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se unen típicamente a un epítipo antigénico, excepto los anticuerpos monoclonales multiespecíficos que se unen a dos o más antígenos o epítopos distintos. Los anticuerpos monoclonales biespecíficos se unen a dos epítopos antigénicos distintos. Los anticuerpos monoclonales pueden tener glicosilación heterogénea dentro de la población de anticuerpos. Los anticuerpos monoclonales pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos, o monovalentes, bivalentes o multivalentes. Un anticuerpo multiespecífico, tal como un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo triespecífico, se incluye en el término anticuerpo monoclonal.

“Anticuerpo aislado” se refiere a un anticuerpo o a un fragmento de unión al antígeno de este que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (p. ej., un anticuerpo aislado que se une específicamente a CD40 humana está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de CD40 humana). En el caso de un anticuerpo biespecífico, el anticuerpo biespecífico se une específicamente a dos antígenos de interés y está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de los dos antígenos de interés. “Anticuerpo aislado” abarca anticuerpos que se aíslan a una mayor pureza, tales como anticuerpos que son 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % puros.

“Anticuerpos humanizados” se refiere a anticuerpos en los cuales al menos una CDR se deriva a partir de especies no humanas y los marcos de la región variable se derivan a partir de secuencias de inmunoglobulinas humanas. Los anticuerpos humanizados pueden incluir mutaciones introducidas intencionalmente en las regiones de marco de manera que el marco puede no ser una copia exacta de las secuencias génicas de las inmunoglobulinas humanas expresadas o de las líneas germinales.

“Anticuerpos humanos” se refiere a anticuerpos que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera en las que tanto el marco como las 6 CDR se derivan a partir de secuencias de origen humano. Si el anticuerpo

contiene una región constante o una porción de la región constante, la región constante también se deriva a partir de secuencias de origen humano.

Un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada o ligera que se derivan a partir de secuencias de origen humano si las regiones variables del anticuerpo se obtienen a partir de un sistema que usa inmunoglobulina de línea germinal humana o genes de inmunoglobulinas reordenados. Tales sistemas ilustrativos son genotecas de genes de inmunoglobulinas humanas presentados en fago, y animales transgénicos no humanos tales como ratones o ratas que portan loci de inmunoglobulinas humanas como se describe en la presente descripción. Un anticuerpo humano contiene, típicamente, diferencias de aminoácidos en comparación con las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana o reordenada debido, por ejemplo, a mutaciones somáticas de origen natural, a la introducción intencional de sustituciones en el marco o en el sitio de unión al antígeno y cambios de aminoácidos introducidos durante la clonación y recombinación de VDJ en animales no humanos. Típicamente, un anticuerpo humano es al menos aproximadamente 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana o reordenado. En algunos casos, un anticuerpo humano puede contener secuencias de marco consenso derivadas a partir del análisis de secuencias de marco humanas, por ejemplo, como se describe en Knappik et

*al.*, J Mol Biol 296:57-86, 2000, o la HCDR3 sintética incorporada en las genotecas de genes de inmunoglobulinas humanas presentadas en fagos, por ejemplo, como se describe en Shi *et al.*, J Mol Biol 397:385-96, 2010 y la publicación de patente internacional núm. WO2009/085462.

“Recombinante” incluye anticuerpos y otras proteínas que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por medios recombinantes.

“Epítipo” se refiere a una porción de un antígeno a la que se une específicamente un anticuerpo. Típicamente, los epítipos consisten en agrupaciones superficiales químicamente activas (tales como polares, no polares o hidrófobas) de entidades tales como aminoácidos o cadenas laterales de polisacáridos y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Un epítipo puede componerse de aminoácidos contiguos y/o discontinuos que forman una unidad espacial conformacional. En un epítipo discontinuo, los aminoácidos de porciones diferentes de la secuencia lineal del antígeno están muy próximos en el espacio tridimensional mediante el plegado de la molécula de proteína.

“Multiespecífico” se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a al menos dos antígenos distintos o dos epítipos distintos dentro de los antígenos, por ejemplo, tres, cuatro o cinco antígenos o epítipos distintos.

“Biespecífico” se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a dos antígenos distintos o a dos epítipos distintos dentro del mismo antígeno. El anticuerpo biespecífico puede tener

reactividad cruzada con otros antígenos relacionados o puede unirse a un epítopo compartido entre dos o más antígenos distintos.

“Variante” se refiere a un polipéptido o un polinucleótido que difiere de un polipéptido de referencia o un polinucleótido de referencia en una o más modificaciones, por ejemplo, sustituciones, inserciones o deleciones.

“Vector” se refiere a un polinucleótido capaz de duplicarse dentro de un sistema biológico o que puede moverse entre tales sistemas. Los polinucleótidos vectores contienen, típicamente, elementos tales como orígenes de replicación, señal de poliadenilación o marcadores de selección, que funcionan para facilitar la duplicación o mantenimiento de esos polinucleótidos en un sistema biológico. Los ejemplos de esos sistemas biológicos pueden incluir una célula, virus, animal, planta, y sistemas biológicos reconstituidos que usan componentes biológicos capaces de duplicar un vector. El polinucleótido que comprende un vector puede ser moléculas de ADN o ARN o un híbrido de estas.

“Vector de expresión” se refiere a un vector que puede usarse en un sistema biológico o en un sistema biológico reconstituido para dirigir la traducción de un polipéptido codificado por una secuencia de polinucleótido presente en el vector de expresión.

“Polinucleótido” se refiere a una molécula sintética que comprende una cadena de nucleótidos unidos covalentemente por un esqueleto de azúcares y fosfatos u otra forma de enlace químico covalente equivalente. El ADNc es un ejemplo típico de un polinucleótido.

“Polipéptido” o “proteína” se refiere a una molécula que comprende al menos dos residuos de aminoácidos unidos por un enlace peptídico para formar un polipéptido. Los polipéptidos pequeños de una cantidad menor que 50 aminoácidos podrían denominarse “péptidos”.

“CD40” o “huCD40” se refiere a la proteína CD40 humana. CD40 es también conocida como el miembro 5 de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF5), receptor CD4OL o receptor CD154. La secuencia de aminoácido de la CD40 humana en toda su extensión se muestra en la sec. con núm. de ident.: 75. La proteína CD40 humana en toda su extensión es una proteína de membrana de tipo I con 277 aminoácidos. La secuencia señal abarca los residuos 1-20, el dominio extracelular abarca los residuos 21-193, el dominio transmembrana abarca los residuos 194-215 y el dominio citoplasmático abarca los residuos 216-277 de la sec. con núm. de ident.: 75. A lo largo de la especificación, el dominio extracelular de CD40, “CD40-ECD”, se refiere al fragmento de CD40 de los residuos 21-193 de la sec. con núm. de ident.: 75.

“Agonista” o “agonistas” se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a CD40 humana que induce la activación de células B y/o células dendríticas (DC) al unirse a CD40. La activación de células B y DC puede determinarse por la medición de la proliferación incrementada de células B o por la medición de la regulación ascendente de cualquiera de los marcadores de superficie CD23, CD80, CD83, CD86 y HLA-DR en células B o CD80, CD83, CD86 y HLA-DR en DC. El agonista puede inducir la

activación de células B y/o DC de una manera estadísticamente significativa cuando se compara con una muestra de control sin el anticuerpo.

“Reticulación” se refiere a la multimerización de orden superior de CD40 en células inducida por un anticuerpo que se une específicamente a CD40 humana que se une a FcγRIIb *cis* o *trans*, lo que produce la inducción de la actividad agonista de CD40. La reticulación puede evaluarse *in vitro* mediante el uso de F(ab')<sub>2</sub> antihumano como un reticulador como se describe en la presente.

“Requiere reticulación para la actividad agonista” significa que el anticuerpo induce la expresión de CD23 en células B y la expresión de superficie de CD83 en células dendríticas en presencia de reticulador F(ab')<sub>2</sub> antihumano a 20 µg/ml en una forma dependiente de la dosis, y que el anticuerpo no tiene efecto en la expresión de superficie de CD23 en células B y en la expresión de superficie de CD83 en células dendríticas en ausencia del reticulador, cuando la expresión de superficie se mide usando citometría de flujo mediante métodos descritos en el Ejemplo 1. Ningún efecto significa que la señal obtenida en la citometría de flujo indicativa de la expresión de superficie de CD23 y CD83 está dentro de una SD ±1 en la curva de titulación de anticuerpos en concentraciones de anticuerpo que varían de  $1 \times 10^{-12}$  M a  $1 \times 10^{-6}$  M.

“Aproximadamente” significa dentro de un rango de error aceptable para el valor particular determinado por el experto, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, es decir, las limitaciones del

sistema de medición. A menos que se indique explícitamente de cualquier otra manera en los ejemplos o en algún otro lugar de la especificación en el contexto de un ensayo, resultado o modalidad particular,

“aproximadamente” significa dentro de una desviación estándar por práctica en la materia, o un rango de hasta 5 %, cualquiera sea el mayor.

“En conjunto con” significa que dos o más agentes terapéuticos se administran a un sujeto juntos en una mezcla, simultáneamente como agentes únicos o secuencialmente como agentes únicos en cualquier orden.

En la presente descripción se usan códigos convencionales de una y tres letras para aminoácidos como se muestra en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.**

| Aminoácido | Código de tres letras | Código de una letra |
|------------|-----------------------|---------------------|
| Alanina    | Ala                   | A                   |
| Arginina   | Arg                   | R                   |
| Asparagina | Asn                   | N                   |
| Aspartato  | Asp                   | D                   |
| Cisteína   | Cys                   | C                   |
| Glutamato  | Gln                   | E                   |
| Glutamina  | Glu                   | Q                   |
| Glicina    | Gly                   | G                   |
| Histidina  | His                   | H                   |
| Isoleucina | Ile                   | I                   |
| Lisina     | Lys                   | K                   |
| Metionina  | Met                   | M                   |

|              |     |   |
|--------------|-----|---|
| Fenilalanina | Phe | F |
| Prolina      | Pro | P |
| Serina       | Ser | S |
| Treonina     | Thr | T |
| Triptófano   | Trp | W |
| Tirosina     | Tyr | Y |
| Valina       | Val | V |

### **Anticuerpos agonistas que se unen específicamente a CD40 humana**

La presente invención proporciona anticuerpos agonistas que se unen específicamente a CD40 que son potentes en la activación de células que presentan antígeno (APC) y células B. Los anticuerpos pueden demostrar una actividad mínima o no agonista en ausencia de reticulación; por lo tanto, los anticuerpos pueden tener un perfil de seguridad mejorado y al mismo tiempo mantener la eficacia cuando se comparan con otros anticuerpos anti-CD40 en el desarrollo clínico para indicaciones de cáncer.

El agonista de CD40 CP-870,893, desarrollado como IgG2 silvestre, se ha probado anteriormente en ensayos clínicos en sujetos que tienen cáncer de páncreas o melanoma. CP-870,893 es capaz de activar APC sin necesidad de reticulación, y es aproximadamente 20 veces más potente en la activación de las células B que de las células dendríticas. Esta actividad superagonista como un mAb soluble bivalente acoplada con la activación preferencial de células B puede llevar al síndrome de liberación de citocina (CRS, por sus siglas en inglés) inducido por IL-6 secretado por células B. En los ensayos clínicos de pacientes, los efectos

secundarios más frecuentes de este anticuerpo fueron CRS moderados, caracterizados por escalofríos, fiebre, rigidez y otros síntomas en el día de la infusión intravenosa del anticuerpo. Por lo tanto, el efecto de CP-870,893 en células B puede resultar en toxicidad que limita la dosis a una dosis de tratamiento que no es suficiente para activar APC.

Los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 humana de la invención que requieren reticulación para su actividad agonista pueden tener una toxicidad potencial inducida por CRS disminuida. Sin desear estar supeditados a ninguna teoría particular, se prevé que es menos probable que las APC circulantes en la periferia sean activadas por los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 de la invención dado que es necesario que los anticuerpos alcancen tejidos para que se produzca una multimerización significativa de orden superior a través de reticulación de FcγR y que ocurra la activación posterior de APC. La activación de APC (por ejemplo, células dendríticas) puede ser de mayor relevancia clínica que la activación de células B. La terapia del cáncer con el agonista de CD40 está firmemente vinculada a la activación de células T (French et al., 1999, *Nature Medicine*, 5:548-553; van Kooten et al., 2000, *J Leucoc Biol*, 67:2-17; Sotomayor et al., 1999, *Nature Medicine*, 5:780-787), y esta activación de células T depende de la activación de células que presentan antígenos profesionales, particularmente, células dendríticas (Melief et al., 2000, 75: 235-282).

La invención proporciona un anticuerpo agonista aislado que se une específicamente a CD40 humana de la sec. con núm. de ident.: 75.

La invención proporciona, además, un anticuerpo agonista aislado que se une específicamente a CD40 humana de la sec. con núm. de ident.: 75, en donde el anticuerpo requiere reticulación para su actividad agonista.

CD40 es una glicoproteína expresada en la superficie celular que pertenece a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) y desempeña un papel central en el sistema inmunitario. Se expresa en una variedad de células inmunes, tales como células B, células dendríticas, monocitos y macrófagos, cuyas células se activan cuando se produce la señalización a través de CD40 (revisado por Tasci et al., 2001, *Cell. Mol. Life. Sci.*, (58), 4-43).

La activación de células dendríticas y células B mediada por señalización de CD40 desencadena varios eventos biológicos, que incluyen la activación de células inmunes, la proliferación y la producción de citocinas y quimocinas. Los métodos para determinar la activación de células dendríticas y células B asociada con CD40 se conocen en la técnica (Schonbeck et al., 2001, *Cell Mol Life Sci.*, 58:40-43; van Kooten et al., 2000, *J. Leuk., Biol.*, 67: 2-17) y se describen en la presente. Un método ilustrativo es la evaluación de la regulación ascendente de marcadores de superficie CD23, CD80, CD83, CD86 y HLA-DR, o una combinación de estos, utilizando métodos estándar tal como citometría.

La dependencia de la reticulación para la actividad agonista puede evaluarse *in vitro* mediante el uso de métodos conocidos. Por ejemplo, la activación de células B o DC puede evaluarse en ausencia y en presencia del

reticulador, tal como el anticuerpo antiinmunoglobulina. *In vivo*, la reticulación se produce, típicamente, a través de la interacción del anticuerpo Fc con FcγR.

Los anticuerpos agonistas ilustrativos que se unen específicamente a CD40 humana que requieren reticulación para su actividad agonista son los anticuerpos C40M67, C40M66, C40M63, C40M62, C40M59, C40M58, C40M56, C40M55, C40M51, C40M18, C40M17, C40M12, C40M102, C40M103, C40M104, C40M105 y C40M121 descritos en la presente.

Un anticuerpo agonista ilustrativo que se une específicamente a CD40 humana que agoniza a CD40 de manera independiente a la reticulación es el anticuerpo C40M126. C40M126 tiene una mutación S267E en una región Fc que convierte al anticuerpo en un agonista independiente de la reticulación. C40M126 y un mAb agonista dependiente de la reticulación C40M121 tienen secuencias de aminoácidos de cadena pesada y de cadena ligera idénticas excepto para la mutación S267E.

La invención proporciona, además, un anticuerpo agonista aislado que se une específicamente a CD40 humana que induce la expresión de CD80, CD83, CD86 y HLA-DR medida utilizando citometría de flujo en células dendríticas humanas.

En alguna modalidad, el anticuerpo agonista aislado que se une específicamente a CD40 humana induce la expresión de CD23, CD80, CD83, CD86 y HLA-DR medida utilizando citometría de flujo en células B humanas.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista aislado que se une específicamente a CD40 humana induce la expresión de CD83 medida utilizando citometría de flujo en células dendríticas humanas.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista aislado que se une específicamente a CD40 humana induce la expresión de CD23 medida utilizando citometría de flujo en células B humanas.

La invención proporciona, además, un anticuerpo agonista aislado o un fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a CD40 humana de la sec. con núm. de ident.: 75, que comprende una región variable de cadena pesada (HCDR) 1 de la sec. con núm. de ident.: 5, una HCDR2 de la sec. con núm. de ident.: 10, una HCDR3 de la sec. con núm. de ident.: 18, una región variable de cadena ligera (LCDR) 1 de la sec. con núm. de ident.: 32, una LCDR2 de la sec. con núm. de ident.: 34 y una LCDR3 de la sec. con núm. de ident.: 47.

En algunas modalidades, el anticuerpo se une a CD40 humana dentro de los residuos 46-64 y 75-76 de la sec. con núm. de ident.: 75. “Dentro” significa que 80 % o más de los residuos del epítipo al que se une el anticuerpo residen dentro de los tramos de los aminoácidos 46-64 o 75-76, y que hasta 20 % de los residuos del epítipo al que se une el anticuerpo residen fuera de los tramos de los aminoácidos 46-64 o 75-76 mencionados.

El epítipo de CD40 al que se une el anticuerpo puede resolverse, por ejemplo, mediante el uso de intercambio de hidrógeno/deuterio (intercambio H/D) o mediante el análisis de una estructura cristalina del anticuerpo en

complejo con CD40. Los residuos del epítipo son aquellos que están protegidos por el anticuerpo mediante una diferencia de al menos 5 % en los niveles de deuteración a través de intercambio H/D o aquellos residuos de aminoácidos de superficie expuesta que se determina se unen al anticuerpo en una estructura cristalina de un complejo del anticuerpo y CD40. En la estructura cristalina de un complejo del anticuerpo y CD40, los residuos del epítipo son aquellos residuos de CD40 que residen dentro de una distancia de 4 Å o menor de cualquiera de los residuos de CDR del anticuerpo.

En un ensayo de intercambio H/D, la proteína CD40 se incubaba en presencia o ausencia del anticuerpo en agua deuterada durante tiempos predeterminados lo que produce la incorporación de deuterio en átomos de hidrógeno intercambiables que no están protegidos por el anticuerpo, seguido de la digestión de la proteína con proteasa y los análisis de los fragmentos peptídicos por medio del uso de LC-MS. En un ensayo ilustrativo, se incubaba 5 µl del anticuerpo de prueba (10 µg) o 5 µl del complejo de CD40 y el anticuerpo de prueba (10 y 7,35 µg, respectivamente) con 120 µl de amortiguador de marcado de óxido de deuterio (fosfato 50 mM, cloruro sódico 100 mM a pH 7,4) durante 0 s, 60 s, 300 s, 1800 s, 7200 s y 14400 s. El intercambio de deuterio se extingue mediante la adición de 63 µl de clorhidrato de guanidina 5 M y el pH final es de 2,5. La muestra extinguida se expone a una digestión en columna con pepsina/proteasa tipo XIII y análisis por LC-MS. Para la digestión con pepsina/proteasa tipo XIII, se desnaturaliza 5 µg de las muestras en 125 µl de amortiguador de control (fosfato 50 mM, cloruro sódico

100 mM a pH 7,4) y se desnaturaliza mediante la adición de 63  $\mu$ l de clorhidrato de guanidina 5 M (el pH final es de 2,5) y la incubación de la mezcla durante 3 min. Después, la mezcla se expone a digestión en columna con pepsina/proteasa tipo XIII y los péptidos resultantes se analizan mediante un sistema de UPLC-MS que comprende una UPLC Waters Acquity acoplada a un espectrómetro de masa Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer (Thermo). Los datos crudos de MS se procesan utilizando HDX WorkBench, software para el análisis de los datos de MS de intercambio de H/D. Los niveles de deuterio se calculan utilizando la diferencia de masa promedio entre el péptido deuterado y su forma nativa ( $t_0$ ). La identificación del péptido se realiza a través de la búsqueda de datos de MS/MS contra la secuencia de CD40 con Mascot. La tolerancia de masa para los iones precursores y producto es de 20 ppm y 0,05 Da, respectivamente.

Para la cristalografía de rayos X, CD40 y el anticuerpo de prueba se expresan y purifican utilizando protocolos estándar. El complejo CD40/anticuerpo de prueba se incuba durante la noche a 4 °C, se concentra y se separa de las especies no complejadas mediante el uso de cromatografía de exclusión por tamaño. El complejo se cristaliza mediante el método de difusión por vapor a partir de varias soluciones de prueba conocidas, por ejemplo, soluciones que contienen PEG3350, citrato amónico y ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES).

Los anticuerpos que se unen dentro de los residuos de CD40 humana 46-64 y 75-76 de la sec. con núm. de ident.: 75 pueden generarse al aislar

anticuerpos que se unen a CD40 usando genotecas de exhibición de fagos, seleccionando aquellos anticuerpos que compiten con el anticuerpo de referencia C40M126 (VH de la sec. con núm. de ident.: 62 y VL de la sec. con núm. de ident.: 69) para unirse a CD40 en un 100 % y confirmando el epítipo de los anticuerpos generados mediante la resolución de la estructura cristalina del complejo anticuerpo/CD40. Alternativamente, los ratones, ratas o conejos pueden inmunizarse mediante el uso de péptidos que abarcan los residuos 46-64 y 75-76 de la sec. con núm. de ident.: 75 y los anticuerpos generados pueden evaluarse respecto de su unión dentro de la región mencionada.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene al menos una de las propiedades siguientes:

se une a CD40 humana de la sec. con núm. de ident.: 75 con una constante de disociación ( $K_D$ ) de aproximadamente  $5 \times 10^{-9}$  M o menor, cuando la  $K_D$  se mide mediante el uso del sistema ProteOn XPR36 a 25 °C en solución salina regulada con fosfato de Dulbecco que contiene 0,01 % de polisorbato 20 (PS-20) y 100 µg/ml de albúmina sérica bovina; o

requiere reticulación para su actividad agonista en células B y en células dendríticas (DC), en donde la actividad agonista en células B se mide por medio de la expresión de superficie de CD23 de células B y la actividad agonista en DC se mide por medio de la expresión de superficie de CD83 en presencia del reticulador F(ab')<sub>2</sub>

antihumano a 20  $\mu\text{g/ml}$  en, cuando la expresión de superficie de CD23 y CD83 se mide con el uso de citometría de flujo.

La afinidad de un anticuerpo a CD40 humana puede determinarse experimentalmente con cualquier método adecuado. Un método ilustrativo utiliza instrumentación ProteOn XPR36, Biacore 3000 o KinExA, ELISA o ensayos de unión competitiva conocidos por los expertos en la técnica. La afinidad medida de un anticuerpo particular por CD40 puede variar si se mide en condiciones diferentes (p. ej., osmolaridad, pH). Por lo tanto, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión (p. ej.,  $K_D$ ,  $K_{on}$ , y  $K_{off}$ ) se realizan, típicamente, en condiciones estandarizadas y con un amortiguador estandarizado, tal como el amortiguador descrito en la presente. Los expertos en la materia apreciarán que el error interno para las mediciones de afinidad por ejemplo por medio del uso del Biacore 3000 o ProteOn (medido como desviación estándar, SD) puede estar típicamente, entre 5-33 % para las mediciones dentro de los límites típicos de detección. Por lo tanto, el término “aproximadamente”, cuando se refiere a un valor  $K_D$ , refleja la desviación estándar típica en el ensayo. Por ejemplo, la SD típica para una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-9}$  M es hasta  $\pm 0,33 \times 10^{-9}$  M.

Para los ensayos de activación de células B, las células B humanas pueden aislarse a partir de PBMC frescas o congeladas con el uso del kit de aislamiento negativo de células B según el protocolo del fabricante (MACS Miltenyi).

Para los ensayos de activación de DC, los monocitos humanos pueden aislarse a partir de PBMC congeladas/frescas utilizando el kit de aislamiento negativo de CD14 según el protocolo del fabricante (MACS Miltenyi), cultivadas durante 5 días en medio completo RPMI (Invitrogen) en presencia de 100 ng/ml de GM-CSF humano e IL-4 humano (Peprotech) y medios renovados cada 2 días. Las titulaciones de los anticuerpos de CD40 de prueba pueden sembrarse en una placa de fondo en U de 96 pocillos y puede añadirse células B o DC y la mezcla puede incubarse durante 15 minutos a temperatura ambiente. Puede añadirse medio o reticulador F(ab')<sub>2</sub> antihumano en una concentración fija de 20 µg/ml y el complejo puede incubarse durante 24 horas para el ensayo de activación de DC y durante 48 horas para el ensayo de activación de células B a 37 °C. Las células pueden recolectarse al final del punto de tiempo, lavarse dos veces con amortiguador de flujo e incubarse con bloque Fc humano (Miltenyi) durante 15 minutos a temperatura ambiente seguido de un lavado. Después, las células se pueden teñir para los marcadores de activación CD23 o CD83 durante 30 minutos en hielo, seguido de dos lavados. Las células se analizan mediante el uso de BD Fortessa. Alternativamente, también puede evaluarse la expresión de superficie de los marcadores de activación CD80, CD86, HLA-DR.

En algunas modalidades, el marco de cadena pesada del anticuerpo se deriva a partir de IGHV4-39\*01 humana (sec. con núm. de

ident.: 73) y el marco de cadena ligera del anticuerpo se deriva a partir de IGLV2-8\*01 humana (sec. con núm. de ident.: 87).

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (VH) de las sec. con núms. de ident.: 62 o 61 y una región variable de cadena ligera (VL) de la sec. con núm. de ident.: 69.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de las sec. con núms. de ident.: 62 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 69.

En algunas modalidades, la VH está codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de polinucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 103 y la VL está codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de polinucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 110.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de las sec. con núms. de ident.: 61 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 69.

En algunas modalidades, la VH está codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de polinucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 102 y la VL está codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de polinucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 110.

En algunas modalidades, el anticuerpo es un isotipo IgG1.

En algunas modalidades, el anticuerpo es un isotipo IgG2.

En algunas modalidades, el anticuerpo es un isotipo IgG3.

En algunas modalidades, el anticuerpo es un isotipo IgG4.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 62 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 69 y es un

isotipo IgG1/ $\lambda$ , que comprende, opcionalmente, una mutación S267E cuando se compara con el IgG1 silvestre.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 62 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 69 y es un isotipo IgG1/ $\lambda$ , que comprende, opcionalmente, una mutación S267E/I332E cuando se compara con el IgG1 silvestre.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 62 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 69 y es un isotipo IgG1/ $\lambda$ , que comprende, opcionalmente, una mutación S267E/L328F cuando se compara con el IgG1 silvestre.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 62 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 69 y es un isotipo IgG1/ $\lambda$ , que comprende, opcionalmente, una mutación de E233D/G237D/H268D/P271G/A330R/P238D cuando se compara con el IgG1 silvestre.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 61 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 69 y es un isotipo IgG1/ $\lambda$ , que comprende, opcionalmente, una mutación S267E cuando se compara con el IgG1 silvestre.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 61 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 69 y es un isotipo IgG1/ $\lambda$ , que comprende, opcionalmente, una mutación S267E/I332E cuando se compara con el IgG1 silvestre.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 61 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 69 y es un isotipo IgG1/ $\lambda$ , que comprende, opcionalmente, una mutación S267E/L328F cuando se compara con el IgG1 silvestre.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 61 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 69 y es un isotipo IgG1/ $\lambda$ , que comprende, opcionalmente, una mutación de E233D/G237D/H268D/P271G/A330R/P238D cuando se compara con el IgG1 silvestre.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) de la sec. con núm. de ident.: 129 y una cadena ligera (LC) de la sec. con núm. de ident.: 136.

En algunas modalidades, la HC está codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de polinucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 155 y la LC está codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de polinucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 162.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) de la sec. con núm. de ident.: 128 y una cadena ligera (LC) de la sec. con núm. de ident.: 136.

En algunas modalidades, la HC está codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de polinucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 154 y la LC está codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de polinucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 162.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) de la sec. con núm. de ident.: 127 y una cadena ligera (LC) de la sec. con núm. de ident.: 136.

En algunas modalidades, la HC está codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de polinucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 153 y la LC está codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de polinucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 162.

En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico.

En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un cáncer.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un tumor sólido.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un melanoma.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un cáncer de pulmón.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un cáncer de pulmón de células no pequeñas escamosas (NSCLC, por sus siglas en inglés).

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un NSCLC no escamosas.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un adenocarcinoma de pulmón.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un carcinoma de células renales (RCC, por sus siglas en inglés) (p. ej., un carcinoma de células claras de riñón o un carcinoma de células papilares de riñón), o una lesión metastásica de este.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un mesotelioma.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un carcinoma nasofaríngeo (NPC, por sus siglas en inglés).

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un cáncer colorrectal.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un cáncer de próstata o cáncer de próstata resistente a la castración.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un cáncer de estómago.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un cáncer de ovario.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un cáncer gástrico.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un cáncer de hígado.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un cáncer de páncreas.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un cáncer de tiroides.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de carcinomas del esófago o tracto gastrointestinal.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un cáncer de mama.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un cáncer de las trompas de Falopio.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un cáncer de cerebro.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un cáncer de la uretra.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de una endometriosis.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un cáncer del cuello del útero.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de una lesión metastásica del cáncer.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un mieloma múltiple.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de un linfoma.

El anticuerpo es adecuado para usar en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de una leucemia.

La invención proporciona, además, un anticuerpo agonista aislado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a CD40 humana de la sec. con núm. de ident.: 75, en donde el anticuerpo tiene al menos una de las propiedades siguientes:

se une a CD40 humana de la sec. con núm. de ident.: 75 con una constante de disociación ( $K_D$ ) de aproximadamente  $5 \times 10^{-9}$  M o menor, cuando la  $K_D$  se mide mediante el uso del sistema ProteOn XPR36 a 25 °C en solución salina regulada con fosfato de Dulbecco que contiene 0,01 % de polisorbato 20 (PS-20) y 100 µg/ml de albúmina sérica bovina; o

requiere reticulación para su actividad agonista en células B y en células dendríticas (DC), en donde la actividad agonista en células B se mide por medio de la expresión de superficie de CD23 de células B y la actividad agonista en DC se mide por medio de la expresión de superficie de CD83 en presencia del reticulador F(ab')<sub>2</sub> antihumano a 20 µg/ml en, cuando la expresión de superficie de CD23 y CD83 se mide con el uso de citometría de flujo.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 1, 8, 22, 28, 38 y 42, respectivamente, la VH y la VL de las sec. con núms. de ident.: 48 y 63, respectivamente y/o la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) de las sec. con núms. de ident.: 114 y 130, respectivamente.

En algunas modalidades, la VH y la VL están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 89 y 104, respectivamente.

En algunas modalidades, la HC y la LC están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 140 y 156, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 2, 7, 25, 26, 39 y 44, respectivamente, la VH y la VL de las sec. con núms. de ident.: 49 y 64, respectivamente y/o la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) de las sec. con núms. de ident.: 115 y 131, respectivamente.

En algunas modalidades, la VH y la VL están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 90 y 105, respectivamente.

En algunas modalidades, la HC y la LC están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 141 y 157, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 2, 7, 24, 26, 39 y 44, respectivamente, la VH y la VL de las sec. con núms. de ident.: 50 y 64, respectivamente y/o la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) de las sec. con núms. de ident.: 116 y 131, respectivamente.

En algunas modalidades, la VH y la VL están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 91 y 105, respectivamente.

En algunas modalidades, la HC y la LC están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 142 y 157, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 2, 7, 23, 26, 39 y 44, respectivamente, la VH y la VL de las sec. con núms. de ident.: 51 y 64, respectivamente; y/o la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) de las sec. con núms. de ident.: 117 y 131, respectivamente.

En algunas modalidades, la VH y la VL están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 92 y 105, respectivamente.

En algunas modalidades, la HC y la LC están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 143 y 157, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 3, 13, 17, 27, 33 y 43, respectivamente; la VH y la VL de identificación de secuencia núm.: 52 y 65, respectivamente; y/o la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) de las sec. con núms. de ident.: 118 y 132, respectivamente.

En algunas modalidades, la VH y la VL están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 93 y 106, respectivamente.

En algunas modalidades, la HC y la LC están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 144 y 158, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 4, 6, 19, 27, 33 y 43, respectivamente; la VH y la VL de identificación de secuencia núm.: 53 y 65, respectivamente; y/o la cadena

pesada (HC) y la cadena ligera (LC) de las sec. con núms. de ident.: 119 y 132, respectivamente.

En algunas modalidades, la VH y la VL están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 94 y 106, respectivamente.

En algunas modalidades, la HC y la LC están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 145 y 158, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 4, 6, 20, 27, 33 y 43, respectivamente; la VH y la VL de identificación de secuencia núm.: 54 y 65, respectivamente; y/o la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) de las sec. con núms. de ident.: 120 y 132, respectivamente.

En algunas modalidades, la VH y la VL están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 95 y 106, respectivamente.

En algunas modalidades, la HC y la LC están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 146 y 158, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 2, 7, 14, 27, 33 y 43, respectivamente; la VH y la VL de

identificación de secuencia núm.: 55 y 65, respectivamente; y/o la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) de las sec. con núms. de ident.: 121 y 132, respectivamente.

En algunas modalidades, la VH y la VL están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 96 y 106, respectivamente.

En algunas modalidades, la HC y la LC están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 147 y 158, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 4, 6, 21, 27, 33 y 43, respectivamente; la VH y la VL de identificación de secuencia núm.: 56 y 65, respectivamente; y/o la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) de las sec. con núms. de ident.: 122 y 132, respectivamente.

En algunas modalidades, la VH y la VL están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 97 y 106, respectivamente.

En algunas modalidades, la HC y la LC están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 148 y 158, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con

núms. de ident.: 4, 9, 15, 30, 36 y 41, respectivamente, la VH y la VL de las sec. con núms. de ident.: 57 y 66, respectivamente; y/o la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) de las sec. con núms. de ident.: 123 y 133, respectivamente.

En algunas modalidades, la VH y la VL están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 98 y 107, respectivamente.

En algunas modalidades, la HC y la LC están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 149 y 159, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 4, 11, 16, 29, 37 y 40, respectivamente, la VH y la VL de las sec. con núms. de ident.: 58 y 67, respectivamente; y/o la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) de las sec. con núms. de ident.: 124 y 134, respectivamente.

En algunas modalidades, la VH y la VL están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 99 y 108, respectivamente.

En algunas modalidades, la HC y la LC están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 150 y 160, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 4, 12, 15, 30, 35 y 46, respectivamente, la VH y la VL de las sec. con núms. de ident.: 59 y 68, respectivamente y/o la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) de las sec. con núms. de ident.: 125 y 135, respectivamente.

En algunas modalidades, la VH y la VL están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 100 y 109, respectivamente.

En algunas modalidades, la HC y la LC están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 151 y 161, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 4, 9, 15, 30, 36 y 41, respectivamente, la VH y la VL de las sec. con núms. de ident.: 57 y 70, respectivamente y/o la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) de las sec. con núms. de ident.: 123 y 137, respectivamente.

En algunas modalidades, la VH y la VL están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 98 y 111, respectivamente.

En algunas modalidades, la HC y la LC están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 149 y 163, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 4, 9, 15, 31, 36 y 41, respectivamente, la VH y la VL de las sec. con núms. de ident.: 57 y 71, respectivamente y/o la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) de las sec. con núms. de ident.: 123 y 138, respectivamente.

En algunas modalidades, la VH y la VL están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 98 y 112, respectivamente.

En algunas modalidades, la HC y la LC están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 149 y 164, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 4, 9, 15, 31, 36 y 41, respectivamente, la VH y la VL de las sec. con núms. de ident.: 57 y 72, respectivamente y/o la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) de las sec. con núms. de ident.: 123 y 139, respectivamente.

En algunas modalidades, la VH y la VL están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 98 y 113, respectivamente.

En algunas modalidades, la HC y la LC están codificadas por un polinucleótido que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 149 y 165, respectivamente.

En algunas modalidades, el anticuerpo de la invención comprende secuencias de aminoácidos de regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) y 3 (HCDR3) de la región variable de cadena pesada (VH) de las sec. con núms. de ident.: 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61 o 62, en donde las HCDR se definen de acuerdo con Kabat, Chothia o IMGT.

En algunas modalidades, el anticuerpo de la invención comprende secuencias de aminoácidos de regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) y 3 (LCDR3) de la región variable de cadena ligera (VL) de las sec. con núms. de ident.: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 70, 71 o 72, en donde las LCDR se definen de acuerdo con Kabat, Chothia o IMGT.

En algunas modalidades, el anticuerpo de la invención comprende la VH de las sec. con núm. de ident.: 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61 o 62.

En algunas modalidades, el anticuerpo de la invención comprende la VL de las sec. con núm. de ident.: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 70, 71 o 72.

La secuencia de HCDR y LCDR de los anticuerpos anti-CD40 ilustrativos de la invención se muestran en la **Tabla 2**. Las secuencias de proteínas y aminoácidos de VH, VL, HC y LC de los anticuerpos anti-CD40 ilustrativos de la invención se muestran en la **Tabla 3**.

**Tabla 2.**

| mAb     | Secuencia con núm. de ident.: |    |       |       |       |       |       |       |
|---------|-------------------------------|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|         | VH                            | VL | HCDR1 | HCDR2 | HCDR3 | LCDR1 | LCDR2 | LCDR3 |
| C40M67  | 48                            | 63 | 1     | 8     | 22    | 28    | 38    | 42    |
| C40M66  | 49                            | 64 | 2     | 7     | 25    | 26    | 39    | 44    |
| C40M63  | 50                            | 64 | 2     | 7     | 24    | 26    | 39    | 44    |
| C40M62  | 51                            | 64 | 2     | 7     | 23    | 26    | 39    | 44    |
| C40M59  | 52                            | 65 | 3     | 13    | 17    | 27    | 33    | 43    |
| C40M58  | 53                            | 65 | 4     | 6     | 19    | 27    | 33    | 43    |
| C40M56  | 54                            | 65 | 4     | 6     | 20    | 27    | 33    | 43    |
| C40M55  | 55                            | 65 | 2     | 7     | 14    | 27    | 33    | 43    |
| C40M51  | 56                            | 65 | 4     | 6     | 21    | 27    | 33    | 43    |
| C40M18  | 57                            | 66 | 4     | 9     | 15    | 30    | 36    | 41    |
| C40M17  | 58                            | 67 | 4     | 11    | 16    | 29    | 37    | 40    |
| C40M12  | 59                            | 68 | 4     | 12    | 15    | 30    | 35    | 46    |
| C40M9   | 60                            | 69 | 5     | 10    | 18    | 32    | 34    | 47    |
| C40M102 | 57                            | 70 | 4     | 9     | 15    | 30    | 36    | 41    |
| C40M103 | 57                            | 71 | 4     | 9     | 15    | 31    | 36    | 41    |
| C40M104 | 57                            | 72 | 4     | 9     | 15    | 31    | 36    | 41    |
| C40M105 | 61                            | 69 | 5     | 10    | 18    | 32    | 34    | 47    |
| C40M121 | 62                            | 69 | 5     | 10    | 18    | 32    | 34    | 47    |
| C40M126 | 62                            | 69 | 5     | 10    | 18    | 32    | 34    | 47    |

**Tabla 3.**

| mAb     | Secuencias de aminoácidos                |                                          |                             |                             | Secuencias de ADN                        |                                          |                                          |                                          |
|---------|------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
|         | VH con identificación de secuencia núm.: | VL con identificación de secuencia núm.: | Sec. con núm. de ident. HC: | Sec. con núm. de ident. LC: | ADN de VH de la sec. con núm. de ident.: | ADN de VL de la sec. con núm. de ident.: | ADN de HC de la sec. con núm. de ident.: | ADN de LC de la sec. con núm. de ident.: |
| C40M67  | 48                                       | 63                                       | 114                         | 130                         | 89                                       | 104                                      | 140                                      | 156                                      |
| C40M66  | 49                                       | 64                                       | 115                         | 131                         | 90                                       | 105                                      | 141                                      | 157                                      |
| C40M63  | 50                                       | 64                                       | 116                         | 131                         | 91                                       | 105                                      | 142                                      | 157                                      |
| C40M62  | 51                                       | 64                                       | 117                         | 131                         | 92                                       | 105                                      | 143                                      | 157                                      |
| C40M59  | 52                                       | 65                                       | 118                         | 132                         | 93                                       | 106                                      | 144                                      | 158                                      |
| C40M58  | 53                                       | 65                                       | 119                         | 132                         | 94                                       | 106                                      | 145                                      | 158                                      |
| C40M56  | 54                                       | 65                                       | 120                         | 132                         | 95                                       | 106                                      | 146                                      | 158                                      |
| C40M55  | 55                                       | 65                                       | 121                         | 132                         | 96                                       | 106                                      | 147                                      | 158                                      |
| C40M51  | 56                                       | 65                                       | 122                         | 132                         | 97                                       | 106                                      | 148                                      | 158                                      |
| C40M18  | 57                                       | 66                                       | 123                         | 133                         | 98                                       | 107                                      | 149                                      | 159                                      |
| C40M17  | 58                                       | 67                                       | 124                         | 134                         | 99                                       | 108                                      | 150                                      | 160                                      |
| C40M12  | 59                                       | 68                                       | 125                         | 135                         | 100                                      | 109                                      | 151                                      | 161                                      |
| C40M9   | 60                                       | 69                                       | 126                         | 136                         | 101                                      | 110                                      | 152                                      | 162                                      |
| C40M102 | 57                                       | 70                                       | 123                         | 137                         | 98                                       | 111                                      | 149                                      | 163                                      |
| C40M103 | 57                                       | 71                                       | 123                         | 138                         | 98                                       | 112                                      | 149                                      | 164                                      |
| C40M104 | 57                                       | 72                                       | 123                         | 139                         | 98                                       | 113                                      | 149                                      | 165                                      |
| C40M105 | 61                                       | 69                                       | 127                         | 136                         | 102                                      | 110                                      | 153                                      | 162                                      |
| C40M121 | 62                                       | 69                                       | 128                         | 136                         | 103                                      | 110                                      | 154                                      | 162                                      |
| C40M126 | 62                                       | 69                                       | 129                         | 136                         | 103                                      | 110                                      | 155                                      | 162                                      |

Las variantes de los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a CD40 de la invención están dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, las variantes pueden comprender una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos en la VH y/o la VL que no afectan desfavorablemente las propiedades del anticuerpo. En algunas modalidades, la identidad de secuencia puede ser de aproximadamente

90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % respecto a la secuencia de aminoácidos de una VH o de la VL de la invención.

El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad =  $\text{núm. de posiciones idénticas} / \text{núm. de posiciones totales} \times 100$ ), teniendo en cuenta el número de interrupciones, y la longitud de cada interrupción, que es necesario introducir para el alineamiento óptimo de las dos secuencias.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse mediante el uso del algoritmo de E. Meyers y W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), que usa una matriz ponderada de sustitución de residuos PAM120, una penalización de longitud de interrupción de 12 y una penalización de interrupción de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse mediante el uso del algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en [http://\\_www\\_gcg\\_com](http://_www_gcg_com)), que usa una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de interrupción de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4, y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista que se une específicamente a CD40 humana comprende la VH que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %

idéntica a la VH de las sec. con núms. de ident.: 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61 o 62.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista que se une específicamente a CD40 humana comprende la VL que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la VL de las sec. con núms. de ident.: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 70, 71 o 72.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista que se une específicamente a CD40 humana de la invención comprende la VH que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la VH de las sec. con núms. de ident.: 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61 o 62 y la VL que es al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la VL de las sec. con núms. de ident.: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 70, 71 o 72.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana de la invención comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 48 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 63, en donde la VH, la VL o tanto la VH como la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana de la invención comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 49 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 64, en donde la VH, la VL o tanto la VH como la VL comprenden, opcionalmente,

una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 50 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 64, en donde la VH, la VL o tanto la VH como la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 51 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 64, en donde la VH, la VL o tanto la VH como la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 52 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 65, en donde la VH, la VL o tanto la VH como la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 53 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 65, en donde la VH, la

VL o tanto la VH como la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 54 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 65, en donde la VH, la VL o tanto la VH como la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 55 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 65, en donde la VH, la VL o tanto la VH como la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 56 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 65, en donde la VH, la VL o tanto la VH como la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana comprende la VH de la sec. con núm.

de ident.: 57 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 66, en donde la VH, la VL o tanto la VH como la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 58 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 67, en donde la VH, la VL o tanto la VH como la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 59 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 68, en donde la VH, la VL o tanto la VH como la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 57 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 70, en donde la VH, la VL o tanto la VH como la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 57 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 71, en donde la VH, la VL o tanto la VH como la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 57 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 72, en donde la VH, la VL o tanto la VH como la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 61 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 69, en donde la VH, la VL o tanto la VH como la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 62 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 69, en donde la VH, la VL o tanto la VH como la VL comprenden, opcionalmente, una, dos, tres,

cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista que se une específicamente a CD40 comprende una región variable de cadena pesada que comprende secuencias de HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias de LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde una o más de las secuencias de CDR comprenden secuencias de aminoácidos específicas basadas en los anticuerpos descritos en la presente (por ejemplo, los anticuerpos que se muestran en la **Tabla 2**) o las modificaciones conservadoras de estas, y en donde los anticuerpos conservan las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a CD40 de la invención.

El anticuerpo agonista que se une específicamente a CD40 humana que comprende ciertas secuencias de HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y modificaciones conservadoras de estas tiene al menos una de las propiedades siguientes:

se une a CD40 humana de la sec. con núm. de ident.: 75 con una constante de disociación ( $K_D$ ) de aproximadamente  $5 \times 10^{-9}$  M o menor, cuando la  $K_D$  se mide mediante el uso del sistema ProteOn XPR36 a 25 °C en solución salina regulada con fosfato de Dulbecco que contiene 0,01 % de polisorbato 20 (PS-20) y 100 µg/ml de albúmina sérica bovina; o

requiere reticulación para su actividad agonista en células B y en células dendríticas (DC), en donde la actividad agonista en células B se mide por medio de la expresión de superficie de CD23 de células B y la actividad agonista en DC se mide por medio de la expresión de superficie de CD83 en presencia del reticulador F(ab')<sub>2</sub> antihumano a 20 µg/ml en, cuando la expresión de superficie de CD23 y CD83 se mide con el uso de citometría de flujo.

“Modificación conservadora” se refiere a las modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene las secuencias de aminoácidos. Las modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Las sustituciones conservadoras son aquellas en las que el aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácidos que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares están bien definidas e incluyen aminoácidos con cadenas laterales acídicas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina, triptófano), cadenas laterales aromáticas (p. ej., fenilalanina, triptófano, histidina, tirosina), cadenas laterales alifáticas (p. ej., glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina), amida (p. ej., asparagina, glutamina),

cadena laterales beta-ramificadas (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales que contienen azufre (cisteína, metionina). Además, cualquier residuo nativo del polipéptido puede sustituirse, además, con alanina, como se describió anteriormente para la mutagénesis por barrido de alanina (MacLennan *et al.*, Acta Physiol. Scand. Suppl. 643:55-67, 1998; Sasaki *et al.*, Adv. Biophys. 35:1-24, 1998). Las sustituciones de aminoácidos para los anticuerpos de la invención pueden realizarse mediante métodos muy conocidos, por ejemplo, mediante mutagénesis por PCR (patente de los EE. UU. núm. 4.683.195). Alternativamente, pueden generarse genotecas de variantes mediante el uso métodos conocidos, por ejemplo, mediante el uso de codones aleatorios (NNK) o no aleatorios, por ejemplo, codones DVK, que codifican 11 aminoácidos (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp). Las variantes de anticuerpos resultantes pueden probarse para sus características mediante el uso de ensayos descritos en la presente descripción.

Aunque las modalidades ilustradas en los Ejemplos comprenden pares de regiones variables, una de una cadena pesada y una de una cadena ligera, un técnico con experiencia reconocerá que las modalidades alternativas pueden comprender regiones variables simples de la cadena pesada o ligera. La región variable simple puede usarse para el análisis de dominios variables capaces de formar un fragmento de unión al antígeno específico y de dos dominios capaz de unirse específicamente, por ejemplo, a CD40. El análisis puede realizarse por métodos de análisis de exhibición

de fagos mediante el uso de, por ejemplo, el enfoque combinatorio dual jerárquico descrito en la publicación de patente internacional núm. WO1992/01047. En este enfoque, se usa una colonia individual que contiene un clon de la cadena H o L para infectar una genoteca completa de clones que codifican la otra cadena (L o H), y el dominio de unión al antígeno obtenido, específico y de doble cadena, se selecciona de acuerdo con técnicas de exhibición de fagos tal como las descritas en la presente y se prueba para determinar su unión a CD40 y su actividad agonista.

Los anticuerpos de la invención pueden generarse mediante el uso de varias tecnologías. Por ejemplo, puede usarse el método de hibridomas de Kohler y Milstein, *Nature* 256:495, 1975 para generar anticuerpos monoclonales. En el método de hibridomas, un ratón u otro animal huésped, tal como un hámster, una rata o un mono, se inmuniza con fragmentos de CD40 humana o de cynomolgus de CD40, tal como el dominio extracelular de CD40, seguido de la fusión de células del bazo de los animales inmunizados con células de mieloma mediante el uso de métodos estándar para formar células de hibridoma (Gooding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)). Las colonias que surgen a partir de células de hibridoma inmortalizadas sencillas se evalúan en cuanto a la producción de anticuerpos con propiedades deseadas, tales como especificidad de unión, reactividad cruzada o falta de esta, y afinidad para el antígeno.

Varios animales huésped pueden usarse para producir los anticuerpos de CD40 de la invención. Por ejemplo, pueden usarse ratones Balb/c para generar anticuerpos de CD40 antihumana de ratón. Los anticuerpos producidos en ratones Balb/c y otros animales no humanos pueden humanizarse mediante el uso de varias tecnologías para generar secuencias más similares a las humanas. Las técnicas de humanización ilustrativas que incluyen la selección de marcos aceptores humanos se conocen e incluyen injerto de CDR (patente de los EE. UU. núm. 5.225.539), injerto de SDR (patente de los EE. UU. núm. 6.818.749), sustitución de la superficie (Padlan, *Mol Immunol* 28:489-499, 1991), sustitución de la superficie de residuos determinantes de especificidad (publicación de patente de los EE. UU. núm. 20100261620), adaptación a humano (o adaptación a marco humano) (publicación de patente de los EE. UU. núm. US2009/0118127), superhumanización (patente de los EE. UU. núm. 7.709.226) y selección guiada (Osbourn *et al.* (2005) *Methods* 36:61-68, 2005; patente de los EE. UU. núm. 5.565.332). En estos métodos, las CDR de anticuerpos parentales se transfieren a marcos humanos que pueden seleccionarse en base a su homología general a los marcos parentales, en base a la longitud de la CDR del marco, la homología o la información estructural canónica, o una combinación de estos.

Los anticuerpos humanizados pueden optimizarse adicionalmente para mejorar su selectividad o afinidad por un antígeno deseado mediante la incorporación de residuos de soporte de marco alterados para

conservar la afinidad de unión (mutaciones inversas) mediante técnicas tales como las descritas en la publicación de patente internacional núm. WO90/007861 y en la publicación de patente internacional núm. WO92/22653, o mediante la introducción de variación en cualquiera de las CDR para mejorar, por ejemplo, la afinidad del anticuerpo.

Pueden usarse ratones transgénicos que portan en su genoma loci de inmunoglobulinas (Ig) humanas para generar anticuerpos humanos contra una proteína objetivo, y se describen, por ejemplo, en la publicación de patente internacional núm. WO90/04036, la patente de los EE. UU. núm. 6150584, la publicación de patente internacional núm. WO99/45962, la publicación de patente internacional núm. WO02/066630, la publicación de patente internacional núm. WO02/43478, Lonberg *et al.* (1994) *Nature* 368:856-9; Green *et al.* (1994) *Nature Genet.* 7:13-21; Green & Jakobovits (1998) *Exp. Med.* 188:483-95; Lonberg y Huszar (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93; Bruggemann *et al.* (1991) *Eur. J. Immunol.* 21:1323- 1326; Fishwild *et al.* (1996) *Nat. Biotechnol.* 14:845-851; Mendez *et al.* (1997) *Nat. Genet.* 15:146-156; Green (1999) *J. Immunol. Methods* 231:11-23; Yang *et al.* (1999) *Cancer Res.* 59:1236-1243; Bruggemann y Taussig (1997) *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:455-458; la publicación de la patente internacional núm. WO02/043478). Los loci de inmunoglobulina endógenos en estos ratones se pueden interrumpir o suprimir, y por lo menos un locus de inmunoglobulina humana total o parcial puede insertarse en el genoma de ratón utilizando recombinación homóloga o no homóloga, utilizando transcromosomas, o utilizando minigenes. Empresas

tales como Regeneron ([http://\\_www\\_regeneron\\_com](http://_www_regeneron_com)), Harbour Antibodies ([http://\\_www\\_harbourantibodies\\_com](http://_www_harbourantibodies_com)), Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT) ([http://\\_www\\_omtinc\\_net](http://_www_omtinc_net)), KyMab ([http://\\_www\\_kymab\\_com](http://_www_kymab_com)), Trianni ([http://\\_www.trianni\\_com](http://_www.trianni_com)) y Ablexis ([http://\\_www\\_ablexis\\_com](http://_www_ablexis_com)) pueden dedicarse a proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado mediante el uso de tecnología, como se describió anteriormente.

Los anticuerpos humanos pueden seleccionarse a partir de una genoteca de presentación de fagos, donde el fago se modifica por ingeniería genética para expresar inmunoglobulinas humanas o porciones de estas tales como Fab, anticuerpos de cadena simple (scFv), o regiones variables de anticuerpos no apareadas o apareadas (Knappik *et al.*, J. Mol Biol 296:57-86, 2000; Krebs *et al.*, J Immunol Meth 254:67-84, 2001; Vaughan *et al.*, Nature Biotechnology 14:309-314, 1996; Sheets *et al.*, PITAS (USA) 95:6157-6162, 1998; Hoogenboom y Winter, J Mol Biol 227:381, 1991; Marks *et al.*, J Mol Biol 222:581, 1991). Los anticuerpos de la invención pueden aislarse, por ejemplo, de genotecas de presentación de fagos que expresan regiones variables de cadena ligera y pesada de anticuerpos como proteínas de fusión con la proteína de cubierta pIX como se describe en Shi *et al.*, J Mol Biol 397:385-96, 2010 y en la publicación de patente internacional núm. WO09/085462). Las genotecas de anticuerpos pueden analizarse en cuanto a la unión del fago a CD40 humana y/o de cynomolgus y los clones positivos obtenidos pueden caracterizarse adicionalmente, y los Fab aislarse a partir de los lisados de

clones, y expresarse como IgG en toda su extensión. Tales métodos de presentación en fago para aislar anticuerpos humanos se describen, por ejemplo, en: las patentes de los EE. UU. núm. 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 concedidas a Ladner *et al.*; las patentes de los EE. UU. núm. 5.427.908 y 5.580.717 otorgadas a Dower *et al.*; las patentes de los EE. UU. núm. 5.969.108 y 6.172.197 otorgadas a McCafferty *et al.*; y las patentes de los EE. UU. núm. 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 concedida a Griffiths *et al.*

La preparación de antígenos inmunogénicos y la producción de anticuerpos monoclonales pueden realizarse mediante el uso de cualquier técnica adecuada, tal como la producción de proteínas recombinantes. Los antígenos inmunogénicos pueden administrarse a un animal en la forma de una proteína purificada, o mezclas de proteínas que incluyen células completas o extractos de células o tejidos, o el antígeno puede formarse *de novo* en el cuerpo del animal a partir de ácidos nucleicos que codifican dicho antígeno o una porción de este.

Los anticuerpos de la invención pueden ser humanos o humanizados.

En algunas modalidades, los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 humana de la invención comprenden un marco de VH derivado de IGHV3-23\*03 humana (sec. con núm. de ident.: 79), IGHV1-69\*01 (sec. con núm. de ident.: 80), IGHV3-23\*01 (sec. con núm. de ident.: 81), IGHV3-23\*04 (sec. con núm. de ident.: 82) o IGHV4-39\*01 (sec. con núm. de ident.: 73).

En algunas modalidades, los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 humana de la invención comprenden un marco de VL derivado de IGKV3-20\*1 humana (sec. con núm. de ident.: 74), IGKV4-1\*01 (sec. con núm. de ident.: 84), IGKV1-39\*01 (sec. con núm. de ident.: 85), IGLV3-1\*01 (sec. con núm. de ident.: 86) o IGLV2-8\*01 (sec. con núm. de ident.: 87).

En algunas modalidades, los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 humana de la invención comprenden un marco de cadena pesada derivado de IGHV3-23\*03 humana (sec. con núm. de ident.: 79) y un marco de cadena ligera derivado de IGKV3-20\*01 humana (sec. con núm. de ident.: 74).

En algunas modalidades, los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 humana de la invención comprenden un marco de cadena pesada derivado de IGHV1-69\*01 humana (sec. con núm. de ident.: 80) y un marco de cadena ligera derivado de IGKV4-1\*01 humana (sec. con núm. de ident.: 84).

En algunas modalidades, los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 humana de la invención comprenden un marco de cadena pesada derivado de IGHV1-69\*01 humana (sec. con núm. de ident.: 80) y un marco de cadena ligera derivado de IGKV1-39\*01 humana (sec. con núm. de ident.: 85).

En algunas modalidades, los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 humana de la invención comprenden un marco

de cadena pesada derivado de IGHV3-23\*01 humana (sec. con núm. de ident.: 81) y un marco de cadena ligera derivado de IGKV1-39\*01 humana (sec. con núm. de ident.: 85).

En algunas modalidades, los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 humana de la invención comprenden un marco de cadena pesada derivado de IGHV3-23\*04 humana (sec. con núm. de ident.: 82) y un marco de cadena ligera derivado de IGLV3-1\*01 humana (sec. con núm. de ident.: 86).

En algunas modalidades, los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 humana de la invención comprenden un marco de cadena pesada derivado de IGHV4-39\*01 humana (sec. con núm. de ident.: 73) y un marco de cadena ligera derivado de IGLV2-8\*01 humana (sec. con núm. de ident.: 87).

Los anticuerpos que comprenden regiones variables de cadena pesada o ligera “derivadas de” un marco particular o secuencia de línea germinal se refieren a los anticuerpos obtenidos a partir de un sistema que usa genes de inmunoglobulina de línea germinal humana, tal como de ratones transgénicos o de genotecas de exhibición de fagos como se describe más adelante. Un anticuerpo “derivado de” un marco o secuencia de línea germinal particular puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de la que se derivó debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas de origen natural o sustituciones intencionales.

Los anticuerpos de la invención pueden ser de un isotipo IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. Los anticuerpos de la invención pueden ser de un tipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4.

Los anticuerpos de la invención pueden modificarse adicionalmente por ingeniería genética para generar anticuerpos modificados con propiedades similares o alteradas en comparación con el anticuerpo parental. La VH, la VL, la VH y la VL, las regiones constantes, el marco de VH, el marco de VL, o cualquiera o todas las seis CDR pueden modificarse por ingeniería genética en los anticuerpos de la invención.

Los anticuerpos de la invención pueden modificarse por ingeniería genética mediante injerto de CDR. Una o más secuencias de CDR de los anticuerpos de la invención pueden injertarse en una secuencia de marco diferente. El injerto de CDR puede realizarse mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades descritas en la presente, y en algunas modalidades de cada una y cualquiera de las modalidades numeradas incluidas más abajo, los anticuerpos de la invención comprenden una VH que comprende la HDCR1 de las sec. con núms. de ident.: 1, 2, 3, 4 o 5, la HCDR2 de las sec. con núms. de ident.: 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13, la HCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25, y la tell que comprende la LCDR1 de las sec. con núms. de ident.: 26, 27, 28, 29, 30, 31 o 32, la LCDR2 de las sec. con núms. de ident.: 33, 34, 35, 36, 37, 38 o 39 y/o la LCDR3 de las sec. con núms. de ident.: 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 o 47, en donde el marco de VH no se deriva

de IGHV3-23\*03 (sec. con núm. de ident.: 79), IGHV1-69\*01 (sec. con núm. de ident.: 80), IGHV3-23\*01 (sec. con núm. de ident.: 81), IGHV3-23\*04 (sec. con núm. de ident.: 82) o IGHV4-39\*01 (sec. con núm. de ident.: 73) y el marco de VL no se deriva de IGLV4-1\*01 (sec. con núm. de ident.: 84), IGKV1-39\*01 (sec. con núm. de ident.: 85), IGLV3-1\*01 (sec. con núm. de ident.: 86) o IGLV2-8\*01 (sec. con núm. de ident.: 87).

Las secuencias de marco a usar pueden obtenerse a partir de bases de datos de ADN públicas o referencias publicadas que incluyen las secuencias de genes de anticuerpos de la línea germinal. Por ejemplo, el ADN de la línea germinal y las secuencias de proteínas codificadas por los genes humanos de región variable de cadena pesada y cadena ligera pueden encontrarse en IMGT®, el sistema internacional de información ImMunoGeneTics® [http://\\_www-imgt\\_org](http://_www-imgt_org). Las secuencias de marco que pueden usarse para reemplazar las secuencias de marco existentes en los anticuerpos de la invención son aquellas que muestran el mayor porcentaje de identidad respecto de los marcos parentales.

Las secuencias de marco de los anticuerpos parentales y modificados por ingeniería genética pueden modificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante mutaciones inversas para restaurar y/o mejorar la unión del anticuerpo resultante al antígeno como se describe, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. núm. 6.180.370. Las secuencias de marco de los anticuerpos parentales y modificados por ingeniería genética pueden modificarse adicionalmente, mediante la mutación de uno o más residuos

dentro de la región del marco, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar los epítomos de células T para de esta manera reducir la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Este enfoque también se denomina “desinmunización” y se describe con mayor detalle en la publicación de patente de los EE. UU. núm. 20030153043.

Los residuos de CDR de los anticuerpos de la invención pueden mutarse para mejorar una o más propiedades de unión del anticuerpo de interés. La mutagénesis dirigida al sitio o la mutagénesis mediada por PCR puede realizarse para introducir la una o más mutaciones y el efecto sobre la unión del anticuerpo, u otra propiedad funcional de interés, puede evaluarse en ensayos *in vitro* o *in vivo* como se describe en la presente descripción y en los ejemplos proporcionados. Las sustituciones ilustrativas que pueden introducirse son modificaciones conservadoras como se describió anteriormente. Por otra parte, típicamente se alteran no más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos dentro de la región CDR.

Pueden hacerse mutaciones en una región de Fc en el anticuerpo de la invención para modular las funciones efectoras del anticuerpo y las propiedades farmacocinéticas.

En algunas modalidades, los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 humana de la invención comprenden al menos una sustitución en un anticuerpo Fc.

Pueden hacerse mutaciones de Fc en el anticuerpo de la invención para modular la vida media del anticuerpo. Por ejemplo, una mutación

M252Y/S254T/T256E puede introducirse para aumentar la vida media del anticuerpo resultante (Dall'Acqua *et al.*, J Biol Chem 281:23514–240, 2006).

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana de la invención comprende al menos una mutación en la región Fc que mejora la unión del anticuerpo a FcγRIIb.

“Unión mejorada a FcγRIIb” se refiere a un aumento estadísticamente significativo en la unión (p. ej. disminución del valor EC<sub>50</sub>) a FcγRIIb por el anticuerpo de la invención que comprende al menos una mutación en la región Fc cuando se compara con el mismo anticuerpo sin la mutación.

La unión del anticuerpo a FcγRIIb puede evaluarse en células modificadas por ingeniería genética para expresar FcγRIIb mediante citometría de flujo. En un ensayo de unión ilustrativo, se siembran 2x10<sup>5</sup> células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se bloquean en amortiguador de tinción de BSA (BD Biosciences, San Jose, USA) durante 30 min a 4 °C. Las células se incuban con un anticuerpo de prueba en hielo durante 1,5 horas a 4 °C. Después de lavarlas dos veces con amortiguador de tinción de BSA, las células se incuban con anticuerpo secundario IgG antihumano marcado con R-PE (Jackson ImmunoResearch Laboratories) durante 45 min a 4 °C. Las células se lavan dos veces en amortiguador de tinción y, después, se resuspenden en 150 µl de amortiguador de tinción que contiene una dilución 1:200 de tintura para células vivas/muertas DRAQ7 (Cell Signaling Technology, Danvers, USA). Las señales PE y DRAQ7 de las células teñidas se detectan por medio del citómetro de flujo Miltenyi MACSQuant (Miltenyi

Biotec, Auburn, USA) con los canales B2 y B4, respectivamente. Las células vivas se separan en portales por exclusión en DRAQ7 y se determina la media geométrica de las señales de fluorescencia para al menos 10.000 eventos vivos recolectados. Se utiliza el software FlowJo (Tree Star) para el análisis. Los datos se grafican como el logaritmo de la concentración de anticuerpos en comparación con las señales de fluorescencia medias. El análisis de regresión no lineal se realiza mediante GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.) y se calculan los valores de EC50.

La unión mejorada del anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana de la invención a FcγRIIb puede mejorar la reticulación de las moléculas CD40 lo que lleva a una activación más fuerte de CD40 por los anticuerpos agonistas de la invención. Las mutaciones de Fc ilustrativas que resultan en anticuerpos que tienen una mayor FcγRIIb son una mutación S267E, una mutación S267D, una mutación S267E/I332E, una mutación S267E/L328F, una mutación G236D/S267E y una mutación E233D/G237D/H268D/P271G/A330R/P238D; la numeración de residuos es de acuerdo con el índice EU.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana de la invención comprende una mutación S267E en la región Fc, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el índice EU.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana de la invención comprende una

mutación S267E/I332E en la región Fc, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el índice EU.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana de la invención comprende una mutación S267E/L328F en la región F, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el índice EU.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana de la invención comprende una mutación E233D/G237D/H268D/P271G/A330R/P238D en la región Fc, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el índice EU.

En algunas modalidades, el anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana de la invención comprende al menos una mutación en la región Fc que mejora la unión del anticuerpo a un receptor Fcγ (FcγR) y/o mejora las funciones efectoras de Fc tal como unión a Clq, citotoxicidad dependiente de complemento (GDC), citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) o fagocitosis (ADCP).

Las posiciones de la región Fc que pueden mutarse para aumentar la unión del anticuerpo a la Fcγ de activación y/o mejorar las funciones efectoras del anticuerpo son las que se describen, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. núm. 6.737.056, la publicación de patente de los EE. UU. núm. 2015/0259434, Shields et al., (2001) J Biol Chem 276:6591-6604, Lazar et al., (2006) Proc Natl Acad Sci, 103:4005-4010, Stavenhagen et al., (2007) Cancer Res 67:8882-8890, Richards et al., (2008) Mol Cancer Ther 7:2517-

2527, Diebold et al. Science; publicado en línea el 13 de marzo de 2014; doi:10.1126/science.1248943, e incluyen las posiciones 236, 239, 243, 256, 290, 292, 298, 300, 305, 312, 326, 330, 332, 333, 334, 345, 360, 339, 378, 396 o 430 (la numeración de residuos es de acuerdo con el índice EU). Las mutaciones ilustrativas que pueden realizarse en forma individual o combinada son una mutación G236A, una mutación S239D, una mutación F243L, una mutación T256A, una mutación K290A, una mutación R292P, una mutación S298A, una mutación Y300L, una mutación V305L, una mutación K326A, una mutación A330K, una mutación I332E, una mutación E333A, una mutación K334A, una mutación A339T y una mutación P396L. Las sustituciones combinadas ilustrativas que producen anticuerpos con una mayor ADCC o ADCP son una mutación S239D/I332E, una mutación S298A/E333A/K334A, una mutación F243L/R292P/Y300L, una mutación F243L/R292P/Y300L/P396L, una mutación F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L y una mutación G236A/S239D/I332E en IgG1.

Las posiciones en la región Fc que pueden mutarse para mejorar la CDC del anticuerpo son las descritas, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional núm. W02014/108198, Idusogie et al., (2001) J Immunol 166:2571-2575 y Moore et al., (2010) Mabs, 2:181-189, e incluyen las posiciones 267, 268, 324, 326, 333, 345 y 430. Las mutaciones ilustrativas que pueden realizarse en forma individual o combinada son una mutación S267E, una mutación F1268F, una mutación S324T, una mutación K326A, una mutación K326W, una mutación E333A,

una mutación E345K, una mutación E345Q, una mutación E345R, una mutación E345Y, una mutación E430S, una mutación E430F y una mutación E430T. Las mutaciones combinadas que resultan en anticuerpos con una mayor CDC son una mutación K326A/E333A, una mutación K326W/E333A, una mutación H268F/S324T, una mutación S267E/H268F, una mutación S267E/S324T y una mutación S267E/H268F/S324T en IgG1.

La habilidad de los anticuerpos monoclonales para inducir ADCC también puede mejorarse por la modificación de sus componentes oligosacarídicos por medio de ingeniería genética. La IgG1 o IgG3 humanas están N-glicosiladas en la Asn297 con la mayoría de los glicanos en las formas biantenarias bien conocidas G0, G0F, G1, G1F, G2 o G2F. Los anticuerpos producidos por células CHO no-modificadas típicamente tienen un contenido del glicano fucosa de aproximadamente al menos 85 %. La eliminación del núcleo de fucosa del oligosacárido tipo complejo biantenario unido a la región Fc aumenta la ADCC de los anticuerpos a través de la unión mejorada a FcγRIIIa sin alterar la unión del antígeno o la actividad CDC. Tales mAbs pueden lograrse mediante el uso de diferentes métodos que se reporta que conducen a la expresión exitosa de anticuerpos con defucosilación relativamente alta que tienen el tipo de complejo biantenario de oligosacáridos Fc tales como el control de la osmolalidad del cultivo (Konno *et al.*, Cytotechnology 64:249-65, 2012), la aplicación de una variante de la línea CHO Lec13 como la línea celular huésped (Shields *et al.*, *J Biol Chem* 277:26733-26740, 2002), la aplicación de una variante de la línea

CHO EB66 como la línea celular huésped (Olivier et al., *MAbs*;2(4), 2010. Publicación electrónica antes de la impresión; PMID:20562582), aplicación de una línea celular de hibridoma de rata YB2/0 como la línea celular huésped (Shinkawa et al., *J Biol Chem* 278:3466-3473, 2003), introducción de un ARN de interferencia pequeño específicamente contra el gen de la  $\alpha$  1,6-fucosiltransferasa (*FUT8*) (Mori et al., *Biotechnol Bioeng*88:901-908, 2004), o coexpresión de  $\beta$ -1,4-*N*-acetilglucosaminiltransferasa III y Golgi  $\alpha$ -manosidasa II o un potente inhibidor de alfa-manosidasa I, kifunensina (Ferrara et al., *J Biol Chem*281:5032-5036, 2006, Ferrara et al., *Biotechnol Bioeng* 93:851-861, 2006; Xhou et al., *Biotechnol Bioeng* 99:652-65, 2008).

En algunas modalidades, los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 humana de la invención tienen una estructura de glicano biantenarico con un contenido de fucosa de aproximadamente entre 0 % a aproximadamente 15 %, por ejemplo, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o 0 %.

En algunas modalidades, los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 humana de la invención tienen una estructura de glicano biantenarico con un contenido de fucosa de aproximadamente 50 %, 40 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o 0 %.

“Contenido de fucosa” significa la cantidad de monosacárido fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297. La cantidad relativa de fucosa es el porcentaje de estructuras que contienen fucosa relacionadas con todas

las glicoestructuras. Estas pueden caracterizarse y cuantificarse por múltiples métodos, por ejemplo: 1) por medio del uso de MALDI-TOF de la muestra tratada con N-glicosidasa F (p. ej. estructuras complejas, híbridas, y oligo- y alta-manosa) como se describe en la publicación internacional de patente núm. WO2008/077546; 2) por la liberación enzimática de los glicanos en Asn297 con la subsecuente derivatización y detección / cuantificación por HPLC (UPLC) con detección de fluorescencia y/o HPLC-MS (UPLC-MS); 3) análisis de proteína intacta del mAb nativo o reducido, con o sin tratamiento de los glicanos en Asn297 con Endo S u otra enzima que cliva entre el primer y el segundo monosacárido GlcNAc, dejando la fucosa unida al primer GlcNAc; 4) digestión del mAb para constituir péptidos por digestión enzimática (p. ej., tripsina o endopeptidasa Lys-C), y la separación, detección y cuantificación posterior por HPLC-MS (UPLC-MS) o 5) la separación de los oligosacáridos del mAb de la proteína del mAb por deglicosilación enzimática específica con PNGase F en Asn 297. Los oligosacáridos liberados pueden marcarse con un fluoróforo, separarse e identificarse por diversas técnicas complementarias que permiten: la caracterización fina de las estructuras glicano por espectrometría de masa de ionización desorción láser asistida por matriz (MALDI, por sus siglas en inglés) por comparación de las masas experimentales con las masas teóricas, la determinación del grado de sialilación por HPLC de intercambio iónico (GlycoSep C), la separación y cuantificación de las formas oligosacáridas de acuerdo con criterios de hidrofiliidad por HPLC de fase

normal (GlycoSep N), y la separación y cuantificación de los oligosacáridos por electroforesis capilar de alto rendimiento-fluorescencia inducida por láser (HPCE-LIF, por sus siglas en inglés).

“Baja fucosa” o “bajo contenido de fucosa”, como se usa en la solicitud, se refiere a anticuerpos con contenido de fucosa de aproximadamente 0 % - 15 %.

“Fucosa normal” o “contenido normal de fucosa”, como se usa en la presente descripción, se refiere a anticuerpos con contenido de fucosa de aproximadamente por encima de 50 %, típicamente aproximadamente por encima de 60 %, 70 %, 80 % o por encima de 85 %.

Los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 de la invención que tienen ADCC, ADCP y/o CDC mejoradas, pueden ser útiles para tratar tumores malignos hematológicos que expresan CD40.

“Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo”, “citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo” o “ADCC” es un mecanismo para inducir la muerte celular que depende de la interacción de células objetivo revestidas de anticuerpos con células efectoras que tienen actividad lítica, tales como células asesinas naturales, monocitos, macrófagos y neutrófilos a través de receptores de Fc gamma (FcγR) expresados en células efectoras. Por ejemplo, las células NK expresan FcγRIIIa, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIIIa. Para evaluar la actividad ADCC de los anticuerpos de la invención, el anticuerpo puede añadirse a las células objetivo en combinación con células efectoras inmunitarias, las que pueden activarse

por los complejos de antígeno y anticuerpo lo que da lugar a la citólisis de la célula objetivo. La citólisis se detecta, generalmente, por la liberación del marcador (p. ej., sustratos radioactivos, colorantes fluorescentes o proteínas intracelulares naturales) de las células lisadas. Las células efectoras ilustrativas para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células NK. Las células objetivo ilustrativas incluyen células que expresan CD40.

“Fagocitosis celular dependiente de anticuerpos” (“ADCP”) se refiere a un mecanismo de eliminación de las células objetivo recubiertas con anticuerpos mediante la internalización por células fagocíticas, tales como macrófagos o células dendríticas. La ADCP puede evaluarse mediante el uso de macrófagos derivados de monocitos como células efectoras y células que expresan CD40 modificadas por ingeniería genética para expresar GFP u otra molécula marcada como células objetivo. La relación célula efectora:objetivo puede ser, por ejemplo, 4:1. Las células efectoras pueden incubarse con las células objetivo durante 4 horas con o sin el anticuerpo contra CD40 de prueba. Después de la incubación, las células pueden desprenderse mediante el uso de Accutase. Los macrófagos pueden identificarse con los anticuerpos anti-CD11 y anti-CD14 acoplados a un marcador fluorescente, y el porcentaje de fagocitosis puede determinarse en base al % de GFP fluorescente en los macrófagos CD11<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> mediante el uso de métodos estándar.

“Citotoxicidad dependiente de complemento” o “CDC”, se refiere a un mecanismo para inducir la muerte celular en la que un dominio efector Fc de un anticuerpo unido objetivo se une y activa el componente del complemento C1q que a su vez activa la cascada del complemento que conduce a la muerte de las células objetivo. La activación del complemento puede originar, además, la deposición de los componentes del complemento sobre la superficie celular objetivo que facilitan la ADCC mediante los receptores del complemento (p. ej., CR3) en los leucocitos. La CDC de células que expresan CD40 puede medirse, por ejemplo, mediante el cultivo de células que expresan CD40 en un medio adecuado, la adición de anticuerpos anti-CD4 a la mezcla, seguido de la adición de suero humano combinado. Después del período de incubación, el porcentaje (%) de células lisadas puede detectarse como % de células teñidas con yoduro de propidio en ensayo de FACS mediante el uso de métodos estándar.

“ADCC mejorada”, “CDC mejorada” y “ADCP mejorada” se refieren a un aumento estadísticamente significativo en la ADCC, CDC y/o ADCP mediada por el anticuerpo de la invención que comprende al menos una mutación en la región cuando se compara con el mismo anticuerpo sin la mutación. ADCC, CDC y/o ADCP, tal como en los ensayos descritos en la presente y en los ensayos descritos en la patente de los EE. UU. núm. 8.871.204.

Además, los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 humana de la invención pueden someterse a modificación

postraduccional mediante procesos tales como glicosilación, isomerización, desglicosilación o modificación covalente no natural tal como la adición de porciones de polietilenglicol (pegilación) y lipidación. Tales modificaciones pueden producirse *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden conjugarse con polietilenglicol (PEGilado) para mejorar sus perfiles farmacocinéticos. La conjugación puede realizarse mediante técnicas conocidas para los expertos en la técnica. Se ha demostrado que la conjugación de anticuerpos terapéuticos con PEG mejora la farmacodinámica sin interferir en la función (Knigh *et al.*, *Platelets* 15:409-18, 2004; Leong *et al.*, *Cytokine* 16:106-19, 2001; Yang *et al.*, *Protein Eng.* 16:761-70, 2003).

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos de la invención modificados para mejorar la estabilidad, selectividad, reactividad cruzada, afinidad, inmunogenicidad u otra propiedad biológica o biofísica deseable se encuentran dentro del alcance de la invención. La estabilidad de un anticuerpo se encuentra influenciada por una serie de factores, que incluyen: (1) empaquetamiento en el núcleo de dominios individuales que afecta su estabilidad intrínseca, (2) interacciones interfaciales proteína/proteína que tienen impacto sobre el apareamiento de HC y LC, (3) ocultación de residuos polares y cargados, (4) red de enlaces de H por residuos polares y cargados; y (5) distribución superficial de residuos cargados y polares entre otras fuerzas intramoleculares e intermoleculares (Worn *et al.*, *J Mol Biol* 305:989-1010, 2001). Los potenciales residuos desestabilizadores de la estructura pueden identificarse en base a la

estructura cristalina del anticuerpo o por modelación molecular en ciertos casos, y el efecto de los residuos sobre la estabilidad del anticuerpo puede probarse mediante la generación y evaluación de variantes que contienen mutaciones en los residuos identificados. Una de las formas para aumentar la estabilidad del anticuerpo es elevar el punto medio de transición térmica ( $T_m$ ) medido por calorimetría diferencial de barrido (DSC). Generalmente, la  $T_m$  de las proteínas se correlaciona con su estabilidad y se correlaciona inversamente con su susceptibilidad al desplegamiento y la desnaturalización en solución y los procesos de degradación que dependen de la tendencia de la proteína a desplegarse (Remmele *et al.*, *Biopharm* 13:36-46, 2000). Una serie de estudios han encontrado una correlación entre la clasificación de la estabilidad física de las formulaciones medida como estabilidad térmica por DSC y la estabilidad física medida por otros métodos (Gupta *et al.*, *AAPS PharmSci* 5E8, 2003; Zhang *et al.*, *J Pharm Sci* 93:3076-89, 2004; Maa *et al.*, *Int J Pharm* 140:155-68, 1996; Bedu-Addo *et al.*, *Pharm Res* 21:1353-61, 2004; Remmele *et al.*, *Pharm Res* 15:200-8, 1997). Los estudios de formulación sugieren que la  $T_m$  de un Fab tiene implicaciones para la estabilidad física a largo plazo del mAb correspondiente.

En algunas modalidades, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo multiespecífico.

En algunas modalidades, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo biespecífico.

Los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 humana de la invención pueden modificarse por ingeniería genética para obtener anticuerpos biespecíficos los que también se encuentran dentro del alcance de la invención.

Los anticuerpos biespecíficos en toda su extensión pueden generarse, por ejemplo, con el uso del intercambio de brazos Fab (p. ej., intercambio de medias moléculas, intercambio en el par cadena pesada – cadena ligera) entre dos anticuerpos bivalentes monoespecíficos por la introducción de mutaciones en la interfase de CH3 de la cadena pesada en cada media molécula para favorecer la formación de heterodímeros de dos medias moléculas de anticuerpos que tienen distinta especificidad ya sea *in vitro* en un ambiente libre de células o mediante el uso de coexpresión. La reacción de intercambio de brazos Fab es el resultado de una reacción de isomerización de enlaces disulfuro y la disociación-asociación de dominios CH3. Los enlaces disulfuro de la cadena pesada en las regiones bisagra de los anticuerpos monoespecíficos parentales se reducen. Las cisteínas libres resultantes de uno de los anticuerpos monoespecíficos parentales forman un enlace disulfuro entre las cadenas pesadas con residuos de cisteína de una segunda molécula de anticuerpo monoespecífico parental y simultáneamente los dominios CH3 de los anticuerpos parentales se liberan y reforman por disociación-asociación. Los dominios CH3 de los brazos Fab pueden diseñarse para favorecer la heterodimerización sobre la homodimerización. El producto resultante es

un anticuerpo biespecífico que tiene dos brazos Fab o medias moléculas cada una de las cuales se une a un epítipo distinto. Pueden usarse mutaciones F405L en una cadena pesada y K409R en otra cadena pesada. Para generar anticuerpos biespecíficos, el primer anticuerpo bivalente monoespecífico y el segundo anticuerpo bivalente monoespecífico se modifican mediante ingeniería genética para tener una mutación F405L o una mutación K409R en la región Fc, los anticuerpos se incuban juntos en condiciones de reducción suficientes para permitir que las cisteínas en la región bisagra se sometan a la isomerización del enlace disulfuro; lo que genera así el anticuerpo biespecífico por intercambio de brazos Fab. Las condiciones de incubación pueden restaurarse óptimamente a no reductoras. Los agentes reductores ilustrativos que pueden usarse son 2-mercaptoetilamina (2-MEA), ditioneitol (DTT), ditioneitol (DTE), glutatión, tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), L-cisteína y beta-mercaptoetanol. Por ejemplo, puede usarse una incubación durante al menos 90 min a una temperatura de al menos 20 °C en presencia de al menos 25 mM de 2-MEA o en presencia de al menos 0,5 mM de ditioneitol a un pH de 5-8, por ejemplo, a un pH de 7,0 o a un pH de 7,4.

Los anticuerpos biespecíficos también pueden generarse con el uso de diseños tales como Knob-in-Hole (Genentech), CrossMAbs (Roche) y el diseño de atracción electrostática (Chugai, Amgen, NovoNordisk, Oncomed), LUZ-Y (Genentech), Strand Exchange Engineered Domain body (SEEDbody) (EMD Serono) y Biclonic (Merus).

La estrategia de “botón en ojal” (ver, p. ej., la publicación internacional núm. WO 2006/028936) puede usarse para generar los anticuerpos biespecíficos en toda su extensión de la invención. Brevemente, los aminoácidos seleccionados que forman la interfase de los dominios CH3 en la IgG humana pueden mutarse en las posiciones que afectan las interacciones de los dominios CH3 para promover la formación de heterodímeros. Un aminoácido con una cadena lateral pequeña (ojal) se introduce en una cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno y un aminoácido con una cadena lateral grande (botón) se introduce en una cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a un segundo antígeno. Después de la coexpresión de los dos anticuerpos, se forma un heterodímero como un resultado de la interacción preferencial de la cadena pesada con un “ojal” con la cadena pesada con un “botón”. Los pares de sustituciones de CH3 ilustrativas que forman un botón son (expresadas como la posición modificada en el primer dominio CH3 de la primera cadena pesada/posición modificada en el segundo dominio CH3 de la segunda cadena pesada): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S y T366W/T366S\_L368A\_Y407V.

La tecnología CrossMAb puede usarse para generar los anticuerpos biespecíficos en toda su extensión de la invención. CrossMAbs, además del uso de la estrategia “botón en ojal” para el intercambio de brazos del promotor Fab, tiene en uno de los brazos

medios los dominios de CH1 y CL intercambiados para asegurar el apareamiento correcto de la cadena ligera del anticuerpo biespecífico resultante (ver, p. ej., la patente de los EE. UU. núm. 8.242.247).

Pueden usarse otras estrategias cruzadas para generar anticuerpos biespecíficos en toda su extensión de la invención al intercambiar los dominios variables o constantes, o ambos, entre la cadena pesada y la cadena ligera o dentro de la cadena pesada en los anticuerpos biespecíficos, ya sea en uno o en ambos brazos. Estos intercambios incluyen, por ejemplo, VH-CH1 con VL-CL, VH con VL, CH3 con CL y CH3 con CH1 como se describe en las publicaciones de patente internacional núms. WO2009/080254, WO2009/080251, WO2009/018386 y WO2009/080252.

Pueden usarse otras estrategias tales como promover la heterodimerización de cadenas pesadas mediante el uso de interacciones electrostáticas al sustituir residuos cargados positivamente en una superficie de CH3 y residuos cargados negativamente en una segunda superficie de CH3, como se describe en la publicación de patente de los EE. UU. núm. US2010/0015133; publicación de patente de los EE. UU. núm. US2009/0182127; publicación de patente de los EE. UU. núm. US2010/028637 o publicación de patente de los EE. UU. núm. US2011/0123532. En otras estrategias, la heterodimerización puede promoverse por las siguientes sustituciones (expresadas como posiciones modificadas en el primer dominio CH3 de la primera cadena pesada/ posición modificada en el segundo dominio CH3 de la segunda cadena

pesada): L351Y\_F405A\_Y407V/T394W,  
 T366I\_K392M\_T394W/F405A\_Y407V,  
 T366L\_K392M\_T394W/F405A\_Y407V, L351Y\_Y407A/T366A\_K409F,  
 L351Y\_Y407A/T366V\_K409F, Y407A/T366A\_K409F o  
 T350V\_L351Y\_F405A\_Y407V/T350V\_T366L\_K392L\_T394W como se  
 describe en la publicación de patente de los EE. UU. núm. US2012/0149876  
 o publicación de patente de los EE. UU. núm. US2013/0195849.

La tecnología LUZ-Y puede usarse para generar los anticuerpos  
 biespecíficos de la invención. En esta tecnología, se añade una cremallera  
 de leucina en el terminal C de los dominios CH3 para impulsar el  
 ensamblaje de heterodímeros a partir de mAbs parental que se elimina  
 después de la purificación como se describe en Wranik *et al.*, (2012) *J Biol  
 Chem* 287(52): 42221-9.

La tecnología SEEDbody puede usarse para generar los  
 anticuerpos biespecíficos de la invención. Los SEEDbodies tienen, en sus  
 dominios constantes, residuos IgG seleccionados sustituidos con residuos  
 IgA para promover la heterodimerización como se describe en la patente  
 de los EE. UU. núm. US20070287170.

Las mutaciones se hacen, típicamente, a nivel de ADN para una  
 molécula tal como el dominio constante del anticuerpo con el uso de  
 métodos estándares.

Los anticuerpos de la invención pueden modificarse mediante  
 ingeniería genética en varios formatos de anticuerpos muy conocidos.

En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos incluyen moléculas de direccionamiento dual de tipo IgG recombinante, en donde los dos lados de la molécula contienen, cada uno, el fragmento Fab o parte del fragmento Fab de al menos dos anticuerpos diferentes; moléculas de fusión de IgG, en donde los anticuerpos de IgG en toda su extensión se fusionan a un fragmento Fab o partes de un fragmento Fab adicionales; moléculas de fusión de Fc, en donde las moléculas de Fv de una sola cadena o diacuerpos estabilizados se fusionan a dominios constantes de cadena pesada, regiones Fc o partes de estas; moléculas de fusión de Fab, en donde distintos fragmentos de Fab se fusionan juntos; anticuerpos basados en ScFv y diacuerpos y anticuerpos de cadena pesada (p. ej., anticuerpos de dominio, nanocuerpos) en donde moléculas de Fv de una sola cadena diferentes o diacuerpos diferentes o anticuerpos de cadena pesada diferentes (p. ej., anticuerpos de dominio, nanocuerpos) se fusionan entre sí o a otra proteína o molécula portadora.

La invención proporciona, además, un anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana que tiene ciertas secuencias de VH y VL, en donde la VH está codificada por un primer polinucleótido y la VL está codificada por un segundo polinucleótido. El polinucleótido puede ser un ácido desoxinucleico complementario (ADNc), y puede tener los codones optimizados para la expresión en el huésped adecuado. La optimización de codones es una tecnología bien conocida.

**Polinucleótido, vectores, células huésped**

La invención proporciona, además, un polinucleótido aislado que codifica la VH del anticuerpo de la invención, la VL del anticuerpo de la invención, la cadena pesada del anticuerpo de la invención o la cadena ligera del anticuerpo de la invención.

La invención proporciona, además, un polinucleótido aislado que codifica la VH de las sec. con núms. de ident.: 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61 o 62.

La invención proporciona, además, un polinucleótido aislado que codifica la VL de las sec. con núms. de ident.: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 o 72.

La invención proporciona, además, un polinucleótido aislado que codifica la VH de las sec. con núms. de ident.: 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61 o 62 y la VL de las sec. con núms. de ident.: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 o 72.

La invención proporciona, además, un polinucleótido aislado que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 o 113.

La invención proporciona, además, un polinucleótido aislado que codifica la cadena pesada de las sec. con núms. de ident.: 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 127, 128 o 129.

La invención proporciona, además, un polinucleótido aislado que codifica la cadena ligera de las sec. con núms. de ident.: 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 o 139.

La invención proporciona, además, un polinucleótido aislado que codifica la cadena pesada de las sec. con núms. de ident.: 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 127, 128 o 129 y una cadena ligera de las sec. con núms. de ident.: 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 o 139.

La invención proporciona, además, un polinucleótido aislado que comprende la secuencia de polinucleótidos de las sec. con núms. de ident.: 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164 o 165.

Las secuencias de polinucleótidos que codifican la VH o la VL o un fragmento de unión al antígeno de estas de los anticuerpos de la invención, o la cadena pesada y la cadena ligera de los anticuerpos de la invención pueden unirse operativamente a uno o más elementos reguladores, tales como un promotor o potenciador, que permiten la expresión de la secuencia de nucleótidos en la célula huésped prevista. El polinucleótido puede ser un ADNc.

La invención proporciona, además, un vector que comprende el polinucleótido de la invención. Tales vectores pueden ser vectores plasmídicos, vectores virales, vectores para la expresión de baculovirus, vectores basados en transposones o cualquier otro vector adecuado para la

introducción del polinucleótido sintético de la invención en un organismo o fondo genético dado por cualquier medio. Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican regiones variables de cadena pesada y/o ligera de los anticuerpos de la invención, unidos opcionalmente a regiones constantes, se insertan en vectores de expresión. Las cadenas ligeras y/o pesadas pueden clonarse en los mismos vectores de expresión o en vectores diferentes. Los segmentos de ADN que codifican cadenas de inmunoglobulina pueden unirse operablemente a las secuencias control en el(los) vector(es) de expresión que aseguran la expresión de los polipéptidos de inmunoglobulina. Tales secuencias control incluyen secuencias señal, promotores (p. ej., promotores asociados naturalmente o heterólogos), elementos potenciadores, y secuencias de terminación de la transcripción, y se seleccionan de modo que sean compatibles con la célula huésped elegida para expresar el anticuerpo. Una vez que el vector se incorpora en el huésped adecuado, el huésped se mantiene bajo condiciones adecuadas para altos niveles de expresión de las proteínas codificadas por los polinucleótidos incorporados.

En algunas modalidades, el vector comprende el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 89 y el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 104.

En algunas modalidades, el vector comprende el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 90 y el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 105.

En algunas modalidades, el vector comprende el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 91 y el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 105.

En algunas modalidades, el vector comprende el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 92 y el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 105.

En algunas modalidades, el vector comprende el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 93 y el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 106.

En algunas modalidades, el vector comprende el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 94 y el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 106.

En algunas modalidades, el vector comprende el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 95 y el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 106.

En algunas modalidades, el vector comprende el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 96 y el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 106.

En algunas modalidades, el vector comprende el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 97 y el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 106.

En algunas modalidades, el vector comprende el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 98 y el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 107.

En algunas modalidades, el vector comprende el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 99 y el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 108.

En algunas modalidades, el vector comprende el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 100 y el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 109.

En algunas modalidades, el vector comprende el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 98 y el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 111.

En algunas modalidades, el vector comprende el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 98 y el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 112.

En algunas modalidades, el vector comprende el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 98 y el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 113.

En algunas modalidades, el vector comprende el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 102 y el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 110.

En algunas modalidades, el vector comprende el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 103 y el polinucleótido de la sec. con núm. de ident.: 110.

Los vectores de expresión adecuados son, típicamente, replicables en los organismos huéspedes ya sea como episomas o como parte integral del ADN cromosomal del huésped. Comúnmente, los vectores de expresión contienen marcadores de selección tales como resistencia a la ampicilina, resistencia a la higromicina, resistencia a la tetraciclina, resistencia a la canamicina o resistencia a la neomicina para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas.

Los elementos promotores y potenciadores adecuados se conocen en la industria. Para la expresión en una célula eucariota, los promotores ilustrativos incluyen promotores del gen de inmunoglobulina de cadena ligera y/o pesada, y elementos potenciadores; promotor inmediato temprano del citomegalovirus; promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple; promotores SV40 temprano y tardío; promotor presente en las repeticiones terminales largas de un retrovirus; promotor de metalotioneína-I de ratón; y varios promotores específicos de tejido conocidos. La selección del vector y promotor adecuado está dentro del nivel de experiencia ordinaria en la industria.

Los vectores ilustrativos que pueden usarse son bacterianos: pBs, phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene, La Jolla, Calif., USA); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3,

pDR540, y pRIT5 (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Eucariotas: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL (Pharmacia), pEE6.4 (Lonza) y pEE12.4 (Lonza).

La invención proporciona, además, una célula huésped que comprende uno o más vectores de la invención. “Célula huésped” se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector. Se entiende que el término célula huésped pretende referirse no solo a la célula en cuestión particular sino a la progenie de una célula de este tipo y, además, a una línea celular estable generada a partir de la célula en cuestión particular. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en las generaciones venideras, ya sea debido a una mutación o influencias del medio ambiente, la progenie puede no ser idéntica a la célula parental, pero todavía se incluyen en el alcance del término “célula huésped”, como se usa en la presente descripción. Tales células huéspedes pueden ser células eucariotas, células procariotas, células de plantas o células de arquea.

*Escherichia coli*, bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacterias, tales como *Salmonella*, *Serratia*, y varias especies de *Pseudomonas* son ejemplos de células huésped procariotas. Otros microbios, tales como levadura, son útiles, además, para la expresión. *Saccharomyces* (p. ej., *S. cerevisiae*) y *Pichia* son ejemplos de células huésped de levaduras adecuadas. Las células eucariotas ilustrativas pueden ser de mamífero, insecto, aves o de otros orígenes animales. Las células eucariotas de mamífero incluyen líneas celulares inmortalizadas tales como hibridomas o

líneas celulares de mieloma tales como SP2/0 (American Type Culture Collection) (ATCC), Manassas, VA, CRL-1581), NS0 (European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, UK, ECACC Núm. 85110503), FO (ATCC CRL-1646) y la línea celular murina Ag653 (ATCC CRL-1580). Una línea celular ilustrativa de mieloma humano es U266 (ATCC CRL-TIB-196). Otras líneas celulares útiles incluyen las derivadas de células de ovario de hámster chino (CHO), tales como CHOK1SV (Lonza Biologics, Walkersville, MD), Potelligent® CHOK2SV (Lonza), CHO-K1 (ATCC CRL-61) o DG44.

La invención proporciona, además, un método para producir un anticuerpo de la invención que comprende cultivar la célula huésped de la invención en condiciones en que el anticuerpo se expresa, y recuperar el anticuerpo producido por la célula huésped. Los métodos para fabricar y purificar los anticuerpos son muy conocidos en la materia. Una vez sintetizados (ya sea químicamente o mediante recombinación), los anticuerpos completos, sus dímeros, cadenas ligeras y/o pesadas individuales, u otros fragmentos de anticuerpos, tales como VH y/o VL, pueden purificarse de acuerdo con procedimientos estándar, que incluyen precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, purificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), electroforesis en gel, y lo similar (ver, generalmente, Scopes, Protein Purification (Springer- Verlag, N.Y., (1982)). Un anticuerpo en cuestión puede ser sustancialmente puro, por ejemplo, al menos aproximadamente 80 % a 85 % puro, al menos aproximadamente 85 % a 90 % puro, al menos

aproximadamente 90 % a 95 % puro, o al menos aproximadamente 98 % a 99 %, o más, puro, por ejemplo, libre de contaminantes tales como restos celulares, macromoléculas, etc. distintos al anticuerpo en cuestión.

Otra modalidad de la invención es un método para producir un anticuerpo agonista que se une específicamente a CD40 humana que comprende:

incorporar el primer polinucleótido que codifica la VH del anticuerpo y el segundo polinucleótido que codifica la VL del anticuerpo en un vector de expresión;

transformar una célula huésped con el vector de expresión;

cultivar la célula huésped en medio de cultivo bajo condiciones en donde la VL y la VH se expresan y forman el anticuerpo; y

recuperar el anticuerpo a partir de la célula huésped o el medio de cultivo.

Las secuencias de polinucleótidos de la invención pueden incorporarse en vectores mediante el uso de métodos estándar de biología molecular. La transformación, el cultivo, la expresión de anticuerpos y la purificación de células huésped se realizan mediante el uso de métodos conocidos.

### **Métodos de tratamiento**

Los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 humana de la invención tienen diagnóstico *in vitro* e *in vivo*, así como utilidades terapéuticas y profilácticas. Por ejemplo, los anticuerpos de la

invención pueden administrarse a células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo*, o a un sujeto para tratar, prevenir y/o diagnosticar una variedad de trastornos, tales como cáncer y enfermedades infecciosas.

Los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 humana de la invención, por ejemplo, los anticuerpos C40M67, C40M66, C40M63, C40M62, C40M59, C40M58, C40M56, C40M55, C40M51, C40M18, C40M17, C40M12, C40M102, C40M103, C40M104, C40M105, C40M121 y C40M126, pueden usarse para el tratamiento y/o prevención de cualquier afección o enfermedad, en donde la mejora en la señalización de CD40 puede ser terapéuticamente eficaz y puede reducir los síntomas de la enfermedad.

Los métodos de la invención pueden usarse para tratar un sujeto perteneciente a cualquier clasificación animal. Los ejemplos sujetos que pueden tratarse incluyen mamíferos tales como seres humanos, roedores, perros, gatos y animales de granja.

Los anticuerpos de la invención pueden ser útiles en la preparación de un medicamento para dicho tratamiento, en donde el medicamento se prepara para la administración en dosificaciones definidas en la presente descripción.

La invención proporciona un método para tratar un cáncer, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo agonista aislado que se une específicamente a la CD40 humana de la invención a un sujeto con necesidad de este durante un tiempo suficiente para tratar el cáncer.

Los sujetos que pueden tratarse con los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 humana de la invención son sujetos a los que se diagnosticó que padecen un cáncer de cerebro, un cáncer de pulmón, un cáncer de hueso, un cáncer de páncreas, un cáncer de piel, un cáncer de cabeza y cuello, un melanoma cutáneo o intraocular, un cáncer uterino, un cáncer ovárico, cáncer rectal, un cáncer de la región anal, un cáncer de estómago, un cáncer gástrico, un cáncer colorrectal, un cáncer de colon, un tumor ginecológico (por ejemplo, sarcomas uterinos, carcinoma de las trompas de Falopio, un carcinoma del endometrio, un carcinoma del cuello uterino, un carcinoma de la vagina o carcinoma de la vulva), un cáncer del esófago, un cáncer del intestino delgado, un cáncer del sistema endocrino (por ejemplo, un cáncer de tiroides, paratiroides o glándulas suprarrenales), sarcomas de tejidos blandos, una leucemia, un mieloma, un mieloma múltiple, un cáncer de la uretra, un cáncer del pene, un cáncer de próstata, una leucemia crónica o aguda, tumores sólidos en la niñez, linfomas linfocíticos, linfoma no Hodgkin, un cáncer de la vejiga, un cáncer de hígado, un cáncer renal, un cáncer del riñón o uréter (por ejemplo, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal) o neoplasmas del sistema nervioso central (por ejemplo, linfoma del SNC primario, tumores del eje espinal, gliomas del tallo cerebral o adenomas pituitarias), un glioma o un fibrosarcoma.

La invención proporciona, además, un método para tratar un tumor sólido, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo agonista aislado que se une específicamente a la CD40

humana de la invención a un sujeto con necesidad de este durante un tiempo suficiente para tratar el tumor sólido.

La invención proporciona, además, un método para tratar un tumor maligno hematológico, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo agonista aislado que se une específicamente a la CD40 humana de la invención a un sujeto con necesidad de este durante un tiempo suficiente para tratar el tumor maligno hematológico.

En algunas modalidades, el tumor sólido es un cáncer de próstata, un cáncer de mama, un cáncer colorrectal, un cáncer pancreático, un cáncer de ovario, un cáncer de pulmón, un cáncer de cuello uterino, un rabdomiosarcoma, un neuroblastoma, un melanoma, un cáncer de vejiga o un cáncer de cabeza y cuello.

En algunas modalidades, el tumor sólido es un melanoma.

En algunas modalidades, el tumor sólido es un cáncer de pulmón.

En algunas modalidades, el tumor sólido es un cáncer de pulmón de células no pequeñas escamosas (NSCLC).

En algunas modalidades, el tumor sólido es un NSCLC no escamoso.

En algunas modalidades, el tumor sólido es un adenocarcinoma de pulmón.

En algunas modalidades, el tumor sólido es un carcinoma de células renales (RCC) (p. ej., un carcinoma de células claras de riñón o un carcinoma de células papilares de riñón), o una lesión metastásica de este.

En algunas modalidades, el tumor sólido es un mesotelioma.

En algunas modalidades, el tumor sólido es un carcinoma nasofaríngeo (NPC).

En algunas modalidades, el tumor sólido es un cáncer colorrectal.

En algunas modalidades, el tumor sólido es un cáncer de próstata o un cáncer de próstata resistente a la castración.

En algunas modalidades, el tumor sólido es un cáncer de estómago.

En algunas modalidades, el tumor sólido es un cáncer de ovario.

En algunas modalidades, el tumor sólido es un cáncer gástrico.

En algunas modalidades, el tumor sólido es un cáncer de hígado.

En algunas modalidades, el tumor sólido es cáncer de páncreas.

En algunas modalidades, el tumor sólido es un cáncer de tiroides.

En algunas modalidades, el tumor sólido es un carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello.

En algunas modalidades, el tumor sólido es un carcinoma del esófago o tracto gastrointestinal.

En algunas modalidades, el tumor sólido es un cáncer de mama.

En algunas modalidades, el tumor sólido es un cáncer de trompa de Falopio.

En algunas modalidades, el tumor sólido es un cáncer de cerebro.

En algunas modalidades, el tumor sólido es un cáncer de uretra.

La invención proporciona, además, un método para mejorar una respuesta inmunitaria, que comprende administrar una cantidad

terapéuticamente eficaz del anticuerpo agonista aislado que se une específicamente a la CD40 humana de la invención a un sujeto con necesidad de este durante un tiempo suficiente para mejorar la respuesta inmunitaria.

“Tratar” o “tratamiento” se refiere al tratamiento terapéutico, en donde el objetivo es ralentizar (disminuir) una enfermedad o cambio fisiológico no deseado, tal como el desarrollo o propagación del tumor o células tumorales, o proporcionar un resultado clínico beneficioso o deseado durante el tratamiento. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen el alivio de síntomas, reducción del grado de la enfermedad, estado de la enfermedad estabilizado (es decir, que no empeora), retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, falta de metástasis, mejora o paliación del estado de la enfermedad y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. “Tratamiento” puede significar, además, prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si el sujeto no recibiera tratamiento. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen a aquellos sujetos que ya tienen las enfermedades o el cambio fisiológico no deseado, así como a aquellos sujetos propensos a tener la enfermedad o el cambio fisiológico.

“Inhibe el crecimiento” (p. ej., en referencia a células tumorales) se refiere a una disminución medible en el crecimiento de células tumorales o tejidos tumorales *in vitro* o *in vivo* cuando se ponen en contacto con un agente terapéutico o una combinación de agentes terapéuticos, en comparación con el crecimiento de las mismas células tumorales o tejidos

tumorales en ausencia del(los) agente(s) terapéutico(s). La inhibición del crecimiento de una célula tumoral o tejido tumoral *in vitro* o *in vivo* puede ser al menos aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 % o 100 %.

“Cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo, el peso del individuo, y la capacidad de un agente terapéutico o una combinación de agentes terapéuticos para inducir la respuesta deseada en el individuo. Los indicadores ilustrativos de un agente terapéutico o una combinación de agentes terapéuticos eficaces incluyen, por ejemplo, mayor bienestar del paciente, reducción en una carga tumoral, detener o ralentizar el crecimiento de un tumor y/o ausencia de metástasis de células cancerosas en otras ubicaciones en el cuerpo.

La invención proporciona, además, un método para mejorar una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana al sujeto con necesidad de este durante un tiempo suficiente para mejorar la respuesta inmunitaria.

En algunas modalidades, el sujeto está inmunocomprometido.

En algunas modalidades, el sujeto tiene el riesgo de estar inmunocomprometido. El sujeto inmunocomprometido puede estar siendo

tratado o ha sido tratado con una terapia de radiación o tratamiento quimioterapéutico.

En algunas modalidades, el sujeto está inmunocomprometido o tiene el riesgo de estar inmunocomprometido como resultado de una infección.

En algunas modalidades, el sujeto tiene una infección viral.

La invención proporciona, además, un método para tratar una infección viral, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo agonista aislado que se une específicamente a la CD40 humana de la invención a un sujeto con necesidad de este durante un tiempo suficiente para tratar la infección viral.

### **Administración/Composiciones farmacéuticas**

Los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 humana de la invención pueden proporcionarse en composiciones farmacéuticas adecuadas que comprenden el anticuerpo y un portador farmacéuticamente aceptable. El portador puede ser un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a CD40. Los vehículos podrían ser líquidos, tales como agua y aceites, lo que incluye aquellos de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, y lo similar. Por ejemplo, puede usarse solución salina al 0,4 % y glicina al 0,3 %. Estas soluciones son estériles y, generalmente, libres de materia particulada. Pueden esterilizarse mediante

técnicas de esterilización convencionales muy conocidas (p. ej., filtración). Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste y reguladores de pH, agentes estabilizadores, espesantes, lubricantes y colorantes, etc. La concentración de las moléculas o anticuerpos de la invención en dicha formulación farmacéutica puede variar ampliamente, es decir, de menos de aproximadamente 0,5 %, usualmente a al menos aproximadamente 1 % a tanto como 15 o 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o 50 % en peso y se seleccionará principalmente en base a la dosis requerida, los volúmenes de líquido, las viscosidades, etc., de acuerdo con el modo de administración particular seleccionado. Las formulaciones y vehículos adecuados, que incluyen otras proteínas humanas, por ejemplo, la albúmina de suero humano, se describen, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21.º edición, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Parte 5, Pharmaceutical Manufacturing págs. 691-1092. Vea, especialmente, las págs. 958-989.

El modo de administración de los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 humana de la invención puede ser cualquier ruta adecuada, tal como administración parenteral, por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o subcutánea, transmucosal (oral, intranasal, intravaginal, rectal) u otros medios apreciados por el experto, como bien se conoce en la técnica. Los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a CD40 pueden administrarse intratumoralmente, a un sitio

de drenaje de ganglios linfáticos para el suministro local en el tumor por medio del uso de métodos conocidos.

Los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 de la invención pueden administrarse a un paciente por cualquier ruta adecuada, por ejemplo, parenteralmente por infusión intravenosa (i.v.) o inyección de bolo, intramuscularmente o subcutáneamente o intraperitonealmente. La infusión i.v. puede administrarse durante, por ejemplo, 15, 30, 60, 90, 120, 180 o 240 minutos, o de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 horas.

La dosis proporcionada a un paciente es suficiente para aliviar o al menos detener parcialmente la enfermedad que se trata (“cantidad terapéuticamente eficaz”) y puede ser algunas veces de 0,005 mg a aproximadamente 100 mg/kg, por ejemplo, de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 30 mg/kg o de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 25 mg/kg, o aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 16 mg/kg o aproximadamente 24 mg/kg, o, por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mg/kg, pero puede ser incluso superior, por ejemplo, aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/kg.

Además, puede administrarse una dosis unitaria fija, por ejemplo, 50, 100, 200, 500 o 1000 mg o la dosis puede basarse en el área de superficie del paciente, por ejemplo, 500, 400, 300, 250, 200 o 100 mg/m<sup>2</sup>. Usualmente entre 1 y 8 dosis, (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8) pueden

administrarse para tratar AL, pero pueden proporcionarse 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más dosis.

La administración de los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 humana de la invención puede repetirse después de un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, cinco semanas, seis semanas, siete semanas, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses o más. Los cursos de tratamiento repetidos son, además, posibles, como lo es la administración crónica. La administración repetida puede ser a la misma dosis o a una dosis diferente. Por ejemplo, los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 humana de la invención pueden administrarse a 8 mg/kg o a 16 mg/kg en un intervalo semanal durante 8 semanas, seguido de administración a 8 mg/kg o a 16 mg/kg cada dos semanas por unas 16 semanas adicionales, seguido de administración a 8 mg/kg o a 16 mg/kg cada cuatro semanas por infusión intravenosa.

Los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 humana pueden administrarse como terapia de mantenimiento, tal como, por ejemplo, una vez a la semana durante un período de 6 meses o más.

Por ejemplo, los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 humana de la invención pueden proporcionarse como una dosificación diaria en una cantidad de aproximadamente 0,1-100 mg/kg, tal como 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80,

90 o 100 mg/kg, por día, en al menos uno de los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40, o alternativamente, al menos una de las semanas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 después de la iniciación del tratamiento, o cualquier combinación de estas, mediante el uso de dosis únicas o divididas de cada 24, 12, 8, 6, 4 o 2 horas, o cualquier combinación de estas.

Los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 humana de la invención pueden administrarse, además, profilácticamente para reducir el riesgo de desarrollar cáncer, retrasar la aparición de la ocurrencia de un evento en la progresión del cáncer y/o reducir el riesgo de recurrencia cuando el cáncer está en remisión. Esto puede ser especialmente útil para los pacientes en donde es difícil ubicar un tumor que se sabe está presentes debido a otros factores biológicos.

Los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 humana de la invención pueden liofilizarse para el almacenamiento y reconstituirse en un portador adecuado antes del uso. Esta técnica ha demostrado ser efectiva con preparaciones de proteínas convencionales y pueden usarse técnicas de liofilización y reconstitución bien conocidas.

### **Terapias de combinación**

La invención proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene un cáncer, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente

eficaz del anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana de la invención en conjunto con un segundo agente terapéutico.

El segundo agente terapéutico puede ser un modulador del punto de regulación inmunitaria, tal como un inhibidor, por ejemplo, un anticuerpo antagonista que se une específicamente a PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG-3 o TIM-3.

El segundo agente terapéutico también puede ser un agonista de una molécula de activación de células T, por ejemplo, un anticuerpo agonista que se une específicamente a 4-1BB, CD27, ICOS o OX40.

El segundo agente terapéutico también puede ser un inhibidor de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa.

Los anticuerpos anti-PD-1 ilustrativos que pueden usarse son OPVIDO® (nivolumab) y KEYTRUDA® (pembrolizumab). KEYTRUDA® (pembrolizumab) se describe en, por ejemplo, la patente de los EE. UU. núm. 8.354.509 y comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 166 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 167. OPVIDO® (nivolumab) se describe en, por ejemplo, la patente de los EE. UU. núm. 8.008.449 (anticuerpo 5C4) y comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 168 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 169. Las secuencias de aminoácidos de nivolumab y pembrolizumab están disponibles, además, a través del registro CAS. Los anticuerpos PD-1 adicionales que pueden usarse se describen en la patente de los EE. UU. núm. 7.332.582, la publicación de patente de los

EE. UU. núm. 2014/0044738, hit. publ. de patente núm. WO2014/17966 y la publicación de patente de los EE. UU. núm. 2014/0356363;

Secuencia con núm. de ident.: 166

QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEW  
MGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYC  
ARRDYRFDMGFDYWGQGTTVTVSS

Secuencia con núm. de ident.: 167

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPR  
LLIYLASY  
LESGVPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQHSRDLPFTFGGGTK  
VEIK

Secuencia con núm. de ident.: 168

QVQLVESGGGVWQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEW  
VAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYC  
ATNDDYWGQGTLVTVSS

Secuencia con núm. de ident.: 169

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD  
ASNRATG  
IPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIK

Los anticuerpos anti-PD-L1 ilustrativos que pueden usarse son durvalumab, atezolizumab y avelumab, y los descritos en, por ejemplo, la publicación de patente de los EE. UU. núm. 2009/0055944, la patente de los EE. UU. núm. 8.552.154, la patente de los EE. UU. núm. 8.217.149 y la patente de los EE. UU. núm. 8.779.108. Durvalumab comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 170 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 171. Atezolizumab comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 172 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 173. Avelumab comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 174 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 175.

Secuencia con núm. de ident.: 170

EVQLVESGGG

LVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAN

IKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREG

GWFGELAFDYWGQGTLVTVSS

Secuencia con núm. de ident.: 171

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIY

DASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFG

QGTEKVEIK

Secuencia con núm. de ident.: 172

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWV  
AW

ISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRH  
WPGGFDYWGQGTLVTVSS

Secuencia con núm. de ident.: 173

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS  
ASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQ  
GTKVEIK

Secuencia con núm. de ident.: 174

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSS  
IYPSGGITFYADTVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIK  
LGTVTTVDYWGQGTLVTVSS

Secuencia con núm. de ident.: 175

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMI  
YDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRV  
FGTGTKVTVL

El segundo agente terapéutico puede ser uno o más de los fármacos  
quimioterapéuticos u otros tratamientos anticáncer conocidos para los  
expertos en la técnica. Los agentes quimioterapéuticos incluyen agentes

alquilantes, antimetabolitos, inhibidores antimicrotubulares, inhibidores de topoisomerasa, inhibidores del receptor tirosina quinasa, inhibidores de la angiogénesis y lo similar. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXAN®); alquilsulfonatos, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carboquone, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno, tales como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato/óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos, tales como aclacinomicinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-FU; análogos de 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, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenales, tales como aminoglutenitida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico, tal como ácido folínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglucido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidamina; mitoguanina; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2''-trichlorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; miembros de la familia de taxoides o taxanos, tales como paclitaxel (TAXOL®) docetaxel (TAXOTERE®) y análogos de estos; clorambucil; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; patente núm. CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; inhibidores del receptor tirosina quinasa y/o angiogénesis, que incluyen sorafenib (NEXAVAR®), sunitinib (SUTENT®), pazopanib (VOTRIENT™),

toceranib (PALLADIA™), vandetanib (ZACTIMA™), cediranib (RECENTIN®), regorafenib (BAY 73-4506), axitinib (AG013736), lestaurtinib (CEP-701), erlotinib (TARCEVA®), gefitinib (IRESSA™), BIBW 2992 (TOVOK™), lapatinib (TYKERB®), neratinib (HKI-272) y lo similar, y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables. Además, en esta definición se incluyen los agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de las hormonas en los tumores, tales como antiestrógenos, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, aromatasa que inhibe 4(5)-imidazoles, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY 117018, onapristona y toremifeno (FARESTON®); y antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables. Además, otros compuestos químicos citotóxicos convencionales como los descritos en Wiemann et al., 1985, en *Medical Oncology* (Calabresi et al., eds.), capítulo 10, McMillan Publishing, son aplicables a los métodos de la presente invención.

Los agentes ilustrativos que pueden usarse en conjunto con los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 humana de la invención incluyen inhibidores de tirosina quinasa y terapias anticáncer dirigidas, tales como Iressa® (gefitinib) y Tarceva (erlotinib) y otros antagonistas de HER2, HER3, HER4 o VEGF. Los antagonistas ilustrativos de HER2 incluyen CP-724-714, HERCEPTIN™ (trastuzumab), OMNITARG™ (pertuzumab), TAK-165, lapatinib (EGFR e inhibidor de HER2) y GW-282974. Los antagonistas de HER3 ilustrativos incluyen

anticuerpos anti-HER3 (ver, por ejemplo, la publicación de patente de los EE. UU. núm. US2004/0197332). Los antagonistas de HER4 ilustrativos incluyen ARNip anti-HER4 (ver, por ejemplo, Maatta *et al.*, Mol Biol Cell 17: 67-79, 2006). Un antagonista de VEGF ilustrativo es Bevacizumab (Avastin™).

Los agentes terapéuticos ilustrativos que pueden usarse en conjunto con los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a la CD40 de la invención incluyen fármacos de cuidado estándar para tumores sólidos.

La combinación del anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana de la invención y el segundo agente terapéutico puede administrarse a lo largo de cualquier período de tiempo conveniente. Por ejemplo, el anticuerpo agonista que se une específicamente a CD40 humana y el segundo agente terapéutico pueden administrarse al sujeto el mismo día e incluso en la misma infusión intravenosa. Sin embargo, el anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana de la invención y el segundo agente terapéutico pueden administrarse, además, en días alternos o semanas o meses alternos, y así sucesivamente. El anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana de la invención y el segundo agente terapéutico pueden administrarse con suficiente proximidad en el tiempo de manera que están presentes simultáneamente (p. ej., en el suero) en niveles detectables en el paciente que se trata. Un curso total de tratamiento con el anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana de la invención que consiste en una cantidad de dosis durante un periodo de tiempo está seguido o precedido por un curso de tratamiento

con el segundo agente terapéutico que consiste en una cantidad de dosis. Un periodo de recuperación de 1, 2 o varios días o semanas puede usarse entre la administración del anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana de la invención y el segundo agente terapéutico.

El anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana de la invención o una combinación del anticuerpo agonista que se une específicamente a la CD40 humana de la invención y el segundo agente terapéutico pueden administrarse junto con cualquier forma de terapia de radiación que incluye radioterapia de haz externo, radioterapia de intensidad modulada (IMRT, por sus siglas en inglés), radiación enfocada y cualquier forma de radiocirugía que incluye Gamma Knife, Cyberknife, Linac y radiación intersticial (p. ej., semillas radioactivas implantadas, balón GliaSite) y/o con cirugía.

Los métodos de radiación focalizada que pueden usarse incluyen la radiocirugía estereotáctica, la radiocirugía estereotáctica fraccionada, y la radioterapia de intensidad modulada (IMRT). Es evidente que la radiocirugía estereotáctica implica la entrega precisa de radiación a un tejido tumoral, por ejemplo, un tumor cerebral, mientras se evita al mismo tiempo el tejido normal, no tumoral circundante. La dosis de radiación que se aplica mediante la radiocirugía estereotáctica puede variar, típicamente, de 1 Gy a aproximadamente 30 Gy, y puede abarcar intervalos intermedios que incluyen, por ejemplo, de 1 a 5, 10, 15, 20, 25, hasta 30 Gy en dosis. Debido a los dispositivos de fijación no invasiva, la radiación estereotáctica no

necesita entregarse en un solo tratamiento. El plan de tratamiento puede duplicarse confiablemente día a día, lo que permite así que se entreguen múltiples dosis fraccionadas de radiación. Cuando se usa para tratar un tumor a lo largo del tiempo, de la radiocirugía se denomina “radiocirugía estereotáctica fraccionada” o FSR. Por el contrario, la radiocirugía estereotáctica se refiere a un tratamiento de una sesión. La radiocirugía estereotáctica fraccionada puede dar como resultado una proporción terapéutica alta, es decir, una tasa alta de muerte de células tumorales y un efecto bajo sobre el tejido normal. El tumor y el tejido normal responden de forma diferente a las dosis altas únicas de radiación frente a múltiples dosis más pequeñas de radiación. Las dosis grandes únicas de radiación pueden matar más tejido normal de lo que pueden varias dosis más pequeñas de radiación. En consecuencia, múltiples dosis más pequeñas de radiación pueden matar más células tumorales mientras se evita la muerte del tejido normal. La dosis de radiación que se aplica mediante la radiación estereotáctica fraccionada puede variar en el intervalo de 1 Gy a aproximadamente 50 Gy, y puede abarcar intervalos intermedios que incluyen, por ejemplo, de 1 a 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, hasta 50 Gy en dosis hipofraccionadas. Puede usarse, además, la radioterapia de intensidad modulada (IMRT, por sus siglas en inglés). La IMRT es un modo avanzado de terapia de radiación de alta precisión tridimensional (3DCRT, por sus siglas en inglés), que utiliza aceleradores lineales controlados por computadora para suministrar dosis precisas de radiación a un tumor

maligno o áreas específicas dentro del tumor; el perfil de cada haz de radiación se forma para ajustar el perfil del objetivo a partir de una vista desde el ojo del haz (BEV, por sus siglas en inglés) con un colimador multiláminas (MLC, por sus siglas en inglés), produciendo de esta manera, una serie de haces. La IMRT permite que la dosis de radiación se adapte más exactamente a la forma tridimensional (3-D) del tumor al modular la intensidad del haz de radiación en múltiples volúmenes pequeños. En consecuencia, la IMRT permite que las dosis de radiación más altas se enfoquen a regiones dentro del tumor mientras se minimiza la dosis a las estructuras críticas normales circundantes. La IMRT mejora la capacidad de adaptar el volumen de tratamiento a formas de tumor cóncavas, por ejemplo, cuando el tumor se envuelve alrededor de una estructura vulnerable, tal como la médula espinal o un órgano principal o un vaso sanguíneo.

### **Anticuerpos antiidiotípicos**

La presente invención proporciona un anticuerpo antiidiotípico que se une al anticuerpo de la invención.

La invención proporciona, además, un anticuerpo antiidiotípico que se une específicamente al anticuerpo que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 48 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 63.

La invención proporciona, además, un anticuerpo antiidiotípico que se une específicamente al anticuerpo que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 49 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 64.

La invención proporciona, además, un anticuerpo antiidiotípico que se une específicamente al anticuerpo que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 50 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 64.

La invención proporciona, además, un anticuerpo antiidiotípico que se une específicamente al anticuerpo que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 51 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 64.

La invención proporciona, además, un anticuerpo antiidiotípico que se une específicamente al anticuerpo que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 52 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 65.

La invención proporciona, además, un anticuerpo antiidiotípico que se une específicamente al anticuerpo que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 53 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 65.

La invención proporciona, además, un anticuerpo antiidiotípico que se une específicamente al anticuerpo que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 54 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 65.

La invención proporciona, además, un anticuerpo antiidiotípico que se une específicamente al anticuerpo que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 55 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 65.

La invención proporciona, además, un anticuerpo antiidiotípico que se une específicamente al anticuerpo que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 55 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 65.

La invención proporciona, además, un anticuerpo antiidiotípico que se une específicamente al anticuerpo que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 57 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 66.

La invención proporciona, además, un anticuerpo antiidiotípico que se une específicamente al anticuerpo que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 58 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 67.

La invención proporciona, además, un anticuerpo antiidiotípico que se une específicamente al anticuerpo que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 59 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 68.

La invención proporciona, además, un anticuerpo antiidiotípico que se une específicamente al anticuerpo que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 57 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 70.

La invención proporciona, además, un anticuerpo antiidiotípico que se une específicamente al anticuerpo que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 57 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 71.

La invención proporciona, además, un anticuerpo antiidiotípico que se une específicamente al anticuerpo que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 57 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 72.

La invención proporciona, además, un anticuerpo antiidiotípico que se une específicamente al anticuerpo que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 61 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 69.

La invención proporciona, además, un anticuerpo antiidiotípico que se une específicamente al anticuerpo que comprende la VH de la sec. con núm. de ident.: 62 y la VL de la sec. con núm. de ident.: 69.

Un anticuerpo antiidiotípico (Id) es un anticuerpo que reconoce los determinantes antigénicos (p. ej., el parátipo o CDR) del anticuerpo. El anticuerpo Id puede ser bloqueador de antígeno o no bloqueador. El Id bloqueador de antígeno puede usarse para detectar el anticuerpo libre en una muestra (p. ej. el anticuerpo contra CD40 de la invención descrito en la presente). El Id no bloqueador puede usarse para detectar el anticuerpo total (libre, parcialmente unido a antígeno, o completamente unido a antígeno) en una muestra. Un anticuerpo Id puede prepararse mediante la inmunización de un animal con el anticuerpo contra el cual se prepara el anti-Id.

Un anticuerpo anti-Id puede usarse, además, como un inmunógeno para inducir una respuesta inmunitaria en otro animal, lo que produce un denominado anticuerpo anti-anti-Id. Un anti-anti-Id puede ser epitópicamente idéntico al mAb original, que indujo el anti-Id. Así, al usar anticuerpos para los determinantes idiotípicos de un anticuerpo monoclonal, es posible identificar otros clones que expresan anticuerpos de especificidad idéntica. Los anticuerpos anti-Id pueden variarse (produciendo, de esta manera, variantes de anticuerpos anti-Id) y/o derivarse mediante cualquier técnica adecuada.

## Inmunconjugados

Un “inmunconjugado” se refiere al anticuerpo de la invención conjugado con una o más moléculas heterólogas.

En algunas modalidades, el anticuerpo de la invención se conjuga con uno o más agentes citotóxicos o un agente de formación de imágenes.

Los agentes citotóxicos ilustrativos incluyen los agentes o fármacos quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (p. ej., toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal, o animal, o fragmentos de estas), y radionucleidos.

El agente citotóxico puede ser uno o más fármacos, tal como un maitansinoide (ver, p. ej., las patentes de los EE. UU. núms. 5.208.020, 5.416.06), una auristatina tal como las entidades DE y DF del fármaco monometilauristatina (MMAE y MMAF) (ver, p. ej., las patentes de los EE. UU. núms. 5.635.483 y 5.780.588, y 7.498.298), una dolastatina, una calicheamicina o derivado de esta (ver, p. ej., las patentes de los EE. UU. núms. 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, y 5.877.296; Hinman *et al.*, (1993) *Cancer Res* 53:3336-3342; y Lode *et al.*, (1998) *Cancer Res* 58:2925-2928); una antraciclina tal como daunomicina o doxorubicina (ver, p. ej., Kratz *et al.*, (2006) *Current Med. Chem* 13:477-523; Jeffrey *et al.*, (2006) *Bioorganic & Med Chem Letters* 16:358-362; Torgov *et al.*, (2005) *Bioconj Chem* 16:717-721; Nagy *et al.*, (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97:829-834; Dubowchik *et al.*, *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12: 1529-1532 (2002); King *et al.*, (2002) *J Med Chem* 45:4336-

4343; y la patente de los EE. UU. núm. 6.630.579), metotrexato, vindesina, un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel, y ortataxel.

El agente citotóxico también puede ser una toxina enzimáticamente activa o un fragmento de esta, tal como la cadena A de difteria, fragmentos activos sin capacidad de unión de la toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de modeccin, alfa sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, diantinas, proteínas de *Phytolacca Americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de *sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos.

El agente citotóxico o un agente de formación de imágenes también puede ser un radionucleido. Los radionucleidos ilustrativos incluyen Ac-225, At-211, I-131, I-125, Y-90, Re-186, Re-188, Sm-153, Bi-212, P-32, Pb-212 y los isótopos radioactivos de Lu. Cuando el radioconjugado se usa para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios centellográficos, por ejemplo, Tc-99 m o I-123 o un marcador de espín para la obtención de imágenes por resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés) (conocida, además, como obtención de imágenes por resonancia magnética, mri), tal como I-123, I-131, In-111, F-19, C-13, N-15 u O-17.

Los conjugados de los anticuerpos de la invención y la molécula heteróloga pueden prepararse mediante el uso de una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-

piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HQ), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bisazido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bisdiazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos bis de flúor activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina ricina puede prepararse como se describe en Vitetta *et al.*, (1987) *Science* 238: 1098. El ácido L-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminopentaacético marcado con carbono-14 (MX- DTPA) es un agente quelante ilustrativo para la conjugación de un radionucleótido al anticuerpo. Ver, p. ej., la patente núm. W094/11026. El enlazador puede ser un “enlazador escindible” que facilita la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador lábil a ácido, un enlazador sensible a peptidasa, un enlazador fotolábil, un enlazador dimetilo o un enlazador que contiene disulfuro (Chari *et al.*, (1992) *Cancer Res* 52: 127-131; patente de los EE. UU. núm. 5.208.020).

Los conjugados de los anticuerpos de la invención y la molécula heteróloga pueden prepararse con reactivos reticuladores tales como BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo- SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-

vinilsulfona)benzoato) que están disponibles comercialmente (p. ej., de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE. UU.).

La invención proporciona, además, un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo que se une específicamente a CD40 de la sec. con núm. de ident.: 75 de la invención unido a un agente terapéutico o un agente de formación de imágenes.

### **Usos y kits de diagnóstico**

La invención proporciona, además, un kit que comprende el anticuerpo antagonista que se une específicamente a la CD40 humana de la invención.

El kit puede usarse para usos terapéuticos y como kits de diagnóstico.

El kit puede usarse para detectar la presencia de CD40 en una muestra biológica.

En algunas modalidades, el kit comprende el anticuerpo antagonista que se une específicamente a la CD40 humana de la invención y reactivos para detectar el anticuerpo. El kit puede incluir otro u otros elementos que incluyen: instrucciones de uso; otros reactivos, por ejemplo, una etiqueta, un agente terapéutico o un agente útil para quelar, o de cualquier otra manera acoplar, un anticuerpo a una etiqueta o agente terapéutico, o una composición radioprotectora; dispositivos u otros materiales para preparar el anticuerpo para la administración; portadores farmacéuticamente aceptables; y dispositivos u otros materiales para su administración a un sujeto.

En algunas modalidades, el kit comprende el anticuerpo de la invención en un recipiente e instrucciones para usar el kit.

En algunas modalidades, el anticuerpo en el kit está marcado.

En algunas modalidades, el kit comprende el anticuerpo C40M67, C40M66, C40M63, C40M62, C40M59, C40M58, C40M56, C40M55, C40M51, C40M18, C40M17, C40MI2, C40MI02, C40MI03, C40M104, C40MI05, C40M121 o C40M126.

### **Métodos para detectar CD40**

La invención proporciona, además, un método para detectar CD40 en una muestra, que comprende obtener la muestra, poner en contacto la muestra con el anticuerpo de la invención y detectar el anticuerpo unido a CD40 en la muestra.

En algunas modalidades, la muestra puede derivarse de orina, sangre, suero, plasma, saliva, ascitis, células circulantes, células circulantes tumorales, células que no se asocian a tejidos (es decir, células libres), tejidos (p. ej., tejido tumoral resecado quirúrgicamente, biopsias, que incluyen aspiración con aguja fina), preparaciones histológicas, y lo similar.

Los anticuerpos de la invención pueden detectarse mediante el uso de métodos conocidos. Los métodos ilustrativos incluyen el marcado directo de los anticuerpos con etiquetas fluorescentes o quimiluminiscentes, o radioetiquetas, o la unión a los anticuerpos de la invención de una entidad fácilmente detectable, tal como biotina, enzimas o etiquetas de epítipo. Las

etiquetas y porciones ilustrativas son rutenio,  $^{111}\text{In}$ -DOTA,  $^{111}\text{In}$ -ácido dietilenetriaminepentaacético (DTPA), peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina y beta-galactosidasa, polihistidina (etiqueta de HIS), colorantes de acridina, colorantes de cianina, colorantes de fluorona, colorantes de oxazina, colorantes de fenantridina, colorantes de rodamina y colorantes Alexafluor®.

Los anticuerpos de la invención pueden usarse en una variedad de ensayos para detectar CD40 en la muestra. Los ensayos ilustrativos son análisis de Membrana de Western, radioinmunoensayo, resonancia de plasmones superficiales, inmunoprecipitación, diálisis de equilibrio, inmunodifusión, inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECL) e inmunohistoquímica, separación de células activadas por fluorescencia (FACS) o ensayo ELISA.

La presente invención se describirá con referencia a los siguientes ejemplos específicos, no limitantes.

## **Ejemplo 1. Materiales y métodos**

### **Generación de antígenos utilizados en los estudios**

La clonación, expresión y purificación de los antígenos se realizó mediante el uso de métodos estándar. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas usadas se muestran más abajo;

**CD40 humana en toda su extensión (huCD40); secuencia con núm. de ident.: 75**

MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVS  
 DCTEFTETECLPCGESEFLDTWNRETHCHQHXYCDPNLGLRVQQKGTS  
 ETDICTCEEHWHCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCP  
 VGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCGPQDRLRAL  
 VVIPIIFGILFAILLVLVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAA  
 PVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ

**Dominio extracelular de CD40 humana (huCD40-ECD); secuencia con núm. de ident.: 76**

EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVS DCTEFTETECLPCGESEFLDT  
 WNRETHCHQHXYCDPNLGLRVQQKGTS ETDICTCEEHWHCTSEACES  
 CVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSC  
 ETKDLVVQQAGTNKTDVVCGPQDRLR

***Macaca fascicularis* (cynomolgus, denominado en la presente como cyno) CD40 (cCD40); secuencia con núm. de ident.: 77**

MVRLPLQCVLWGCLLTAVYPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVS  
 DCTEFTETECLPCSESEFLDTWNRETRCHQHXYCDPNLGLRVQQKGTS  
 ETDICTCEEGLHCMSESCESCVPHRSCLPFGFGVKQIATGVSDTICEPCP  
 VGFFSNVSSAFEKCRPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCGPQDRQRAL

VVIPICLGILFVILLVLVFIKKVAKKPNDKAPHPKQEPQEINFLDDLPGSNP  
AAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ

**Dominio extracelular de CD40 de cyno (cCD40-ECD); secuencia con  
número de identificación: 78**

EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVS DCTEFTETECL  
PCSESEFLDTWNRETRCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGL  
HCMSESCESCVPHRSCLPFGVVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAF  
EKCRPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCGPQDRQR

**CD154 humana en toda su extensión; secuencia con número de identificación: 83**

MIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIED  
ERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKK  
ENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENG  
KQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANT  
HSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFVNVTDP SQVSHGTGFTSFGLL

**CD154 humana soluble; secuencia con número de identificación: 88**

MQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQL  
TVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTH  
SSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFVNVTDP SQVSHGTGFTSFGLLKL

**CD154 de cyno soluble (sec. con número de identificación: 45)**

MQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQL  
TVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTH  
SSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKL

### **Ensayo de unión en células dendríticas (DC) humanas y de cyno primarias**

Los monocitos humanos se aislaron de PBMC congeladas/frescas con un kit de aislamiento negativo de CD14 según el protocolo del fabricante (MACS Miltenyi). Los monocitos de cyno se aislaron de PBMC frescas con un kit de aislamiento positivo de CD14 según el protocolo del fabricante (MACS Miltenyi). Para generar DC, se cultivaron monocitos durante 5 días en medio RPMI completo (Invitrogen) en presencia de 100 ng/ml de GM-CSF humano e IL-4 (Peprotech) y el medio se reabasteció cada 2 días. El día 5, las DC se estimularon con 100 ng/ml de LPS (Sigma) durante 24 horas. Después, las células se tiñeron con cada uno de los anticuerpos de CD40 probados a una concentración diferente en amortiguador de citometría de flujo (PBS + 1 % de FBS; BD Bioscience) en 100 µl de volumen durante 30 minutos en hielo seguido de dos lavados con amortiguador de flujo. Después, las células se tiñeron durante 30 minutos adicionales en hielo con IgG antihumana conjugada con APC (Jackson ImmunoResearch) en la dilución recomendada 1:100 y se lavaron dos veces con amortiguador de flujo. Las células se analizaron por porcentaje

positivo e intensidad de fluorescencia media (MFI, por sus siglas en inglés) para determinar la unión al anticuerpo usando Fortessa (BD Bioscience).

### **Ensayo de unión en Raji (línea celular de linfoma de células B) y HEKCD40**

Se obtuvieron células Raji de ATCC y la línea celular HEKCD40 se obtuvo de Invivogen. Las células se cultivaron en medio RPMI completo según la recomendación de la compañía. La tinción se realizó como se describió anteriormente para el ensayo de unión en DC de cyno y humanas primarias.

### **Ensayo de activación de DC y células B humanas**

Las DC humanas se generaron como se describió anteriormente. Las células B humanas se aislaron de PBMC frescas o congeladas con un kit de aislamiento negativo de células B según el protocolo del fabricante (MACS Miltenyi). Las titulaciones de cada anticuerpo de CD40 se sembraron en una placa de fondo en U de 96 pocillos y se añadieron las células y la mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadió medio o reticulador F(ab')<sub>2</sub> antihumano en una concentración fija de 20 µg/ml y el complejo se incubó durante 24 horas para el ensayo de DC y durante 48 horas para el ensayo de células B en un incubador a 37 °C. Las células se recolectaron al final del punto de tiempo, se lavaron dos veces con amortiguador de flujo y se incubaron con bloque Fc humano (Miltenyi) durante 15 minutos a temperatura ambiente seguido de

un lavado. Después, las células se tiñeron para los marcadores de activación CD80, CD83, CD86, HLA-DR y CD23 (BD Bioscience y BioLegend) durante 30 minutos en hielo, seguido de dos lavados. Las células se analizaron mediante el uso de BD Fortessa.

### **Ensayo de activación de células B de cyno**

Las células B de cyno se aislaron de PBMC frescas con un kit de aislamiento positivo de células B según el protocolo del fabricante (MACS Milteny). Los ensayos de activación se configuraron como se describió anteriormente para células B y DC humanas.

### **Ensayo de activación HEK-Blue™ CD40L NF-κB**

Se usaron células HEK-Blue™ CD40L que sobreexpresan CD40 (Invivogen) para evaluar la capacidad de los anticuerpos para bloquear la interacción de CD40-CD154 o activar CD40. Las líneas celulares HEK-Blue™ CD40L expresan establemente CD40 y fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) inducible por NF-κB. La activación de CD40 en células HEK-Blue™ CD40L induce eventos de señalización corriente abajo que llevan a la activación de NF-κB y secreción de SEAP, que puede medirse con el uso de QUANTI-Blue™ de acuerdo con la instrucción del fabricante. Los anticuerpos anti-CD40 se evaluaron en cuanto a su capacidad para bloquear o agonizar la activación de CD40.

### **Inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B dependiente de CD40 en la línea celular HEK-Blue CD40L**

Las líneas celulares HEK-Blue™ CD40L (Invivogen), que se manejaron y mantuvieron de acuerdo con el protocolo del proveedor, se sembraron en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos a una densidad celular de  $2,5 \times 10^4$  células por pocillos en 100  $\mu$ l de volumen. Las placas de ensayo se cubrieron y las células se recuperaron durante la noche (37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>). El día siguiente, se prepararon soluciones 4X de rhCD154-ECD-His (40 ng/ml de concentración final) y 4X anti-CD40 mAbs, o Fabs, en las concentraciones apropiadas (1 – 25  $\mu$ g/ml de concentración final) y 100  $\mu$ l/pocillo de las soluciones 2X resultantes se añadieron a las placas de ensayo de 96 pocillos que contenían células HEK-Blue CD40L™ (200  $\mu$ l/pocillo de volumen final). Después de un tiempo de incubación de 16-24 h (37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>) los sobrenadantes se analizaron para determinar la actividad de fosfatasa en una placa de ensayo de 96 pocillos mediante la adición de 40  $\mu$ l/pocillo de sobrenadantes a 160  $\mu$ l/pocillo de QUANTI-Blue™ (Invivogen) precalentado, que se preparó de acuerdo con el protocolo del proveedor. Las placas se sellaron y se incubaron durante 30-60 minutos antes de obtener la absorbancia a 650 nm.

### **Activación de NF-kB dependiente de CD40 en la línea celular HEK-Blue CD40L NFkB-SEAP**

Se sembraron células HEK-Blue™ CD40L según se describió anteriormente y se recuperaron durante la noche. Al día siguiente, se añadió mAbs de CD40 como soluciones 2X a la placa de 96 pocillos que contenía células HEK-Blue™ CD40L (200 µl de volumen final/pocillo) y la placa se incubó durante la noche (37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>). Para medir la actividad agonista de los mAbs anti-CD40 solos, se usó un amplio rango de concentración del ensayo final de 1-25 µg/ml. Para determinar el efecto de la reticulación en la actividad agonista de mAbs anti-CD40, se preincubó una solución 4X de anticuerpo y una solución 4X de fragmento de F(ab')<sub>2</sub> con el fragmento de Fc anti-hIgG (5 – 10 veces de exceso respecto de mAb) a TA durante 1 hora antes de la adición a las células; se usó una titulación que comienza a 1 µg/ml de mAb anti-CD40 para obtener curvas de dosis. Después de un tiempo de incubación de 16-24 h (37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>), los sobrenadantes se analizaron para determinar la actividad de fosfatasa en una placa de ensayo de 96 pocillos mediante la adición de 40 µl/pocillo de sobrenadantes a 160 µl/pocillo de QUANTI-Blue™ (Invivogen) precalentado, que se preparó de acuerdo con el protocolo del proveedor. Las placas se sellaron y se incubaron durante 30-60 minutos antes de obtener la absorbancia a 650 nm.

### **Ejemplo 2. Aislamiento de anticuerpos anti-CD40 a partir de genotecas de presentación en fago**

## **Aislamiento de anticuerpos anti-CD40 a partir de genotecas de presentación en fago**

Se seleccionaron Fab que se unen a CD40 a partir de genotecas de presentación en fago pIX *de novo* como se describe en Shi *et al.*, J Mol Biol 397:385-96, 2010, publicación de patente internacional núm. WO2009/085462 y la publicación de patente de los EE. UU. núm. US2010/0021477. En resumen, las genotecas se generaron mediante la diversificación de supercóntigos humanos donde los genes de VH de la línea germinal IGHV1-69\*01, IGHV3-23\*01, e IGHV5-51\*01 se recombinaron con el minigen IGHJ-4 humano a través del bucle de H3, y los genes de VL kappa de la línea germinal humana O12 (IGKV1-39\*01), L6 (IGKV3-11\*01), A27 (IGKV3-20\*01), y B3 (IGKV4-1\*01) se recombinaron con el minigen IGKJ-1 para ensamblar dominios VH y VL completos. Para la diversificación se seleccionaron las posiciones en las regiones variables de cadena pesada y ligera en torno a los bucles H1, H2, L1, L2 y L3 correspondientes a las posiciones que se han identificado como frecuentemente en contacto con antígenos proteicos y peptídicos. La diversidad de secuencia en las posiciones seleccionadas se limitó a los residuos que aparecen en cada posición en las familias de genes de las líneas germinales IGHV o IGLV de los genes IGHV o IGLV respectivos. La diversidad en el bucle H3 se generó mediante el uso de bucles sintéticos de tamaño corto a medio de 7-14 aminoácidos de longitud. La distribución de aminoácidos en H3 se diseñó para simular la variación observada de aminoácidos en los anticuerpos humanos. El diseño de genotecas se detalla

en Shi *et al.*, J Mol Biol 397:385-96, 2010. Los supercóntigos utilizados para generar las genotecas se denominaron de acuerdo con el origen de los genes de las líneas germinales VH y VL humanas. Las tres genotecas de cadena pesada se combinaron con las cuatro cadenas ligeras de la línea germinal o se combinaron con las genotecas de cadena ligera diversificadas para generar 12 combinaciones VH:VL únicas. Estas genotecas se combinaron posteriormente aún más en base a versiones de genoteca para generar genotecas adicionales para experimentos de selección contra CD40.

Las genotecas se seleccionaron contra huCD40-ECD o cCD40-ECD biotinilados fusionados a FC. El antígeno biotinilado se capturó en perlas magnéticas de estreptavidina (Dyna) y se expuso a las genotecas pIX Fab *de novo* en una concentración final de 100 nM o 10 nM. Los fagos no específicos se lavaron en PBS-Tween y los fagos unidos se recuperaron por la infección de células TG1 de *E. coli*. Los fagos se amplificaron a partir de estas células durante la noche y la selección se repitió durante un total de cuatro rondas. Después de cuatro rondas de selección por afinidad, los Fabs monoclonales se analizaron para determinar la unión a huCD40-ECD y cCD40-ECD fusionados a Fc o a su etiqueta His en una placa de ELISA por medio de FD antihumano de oveja, se añadió CD40 biotinilado a los Fabs capturados, seguido de la detección de antígenos con HRP de estreptavidina. Los clones que demostraron unión tanto a las versiones humanas como de cyno de CD40 se secuenciaron en las regiones de cadena variable pesada y ligera.

Los clones seleccionados se maduraron aún más por afinidad. Dado que los resultados de la selección por afinidad *de novo* se agruparon por cadenas pesadas, no se conoció el resultado de apareamiento monoclonal de cadenas ligeras. Por lo tanto, se realizó la maduración por afinidad de manera que las cadenas pesadas de cada resultado de selección *de novo* se clonaron en las cuatro genotecas de v5 de cadena ligera kappa posibles.

La región VH de cada resultado *de novo* se amplificó por PCR y se clonó en las genotecas de cadena ligera a través de sitios de enzimas de restricción XhoI y NcoI. Estas genotecas se prepararon en el fago M13 y se usaron para la selección y análisis como se describió con la excepción de concentraciones de antígeno reducidas (10 nM, 1 nM, 0,3 nM), a través de tres rondas de selección por afinidad. Además, se realizó un lavado prolongado durante una hora en la tercera ronda antes de las infecciones de células con *E. coli*. Los Fabs monoclonales obtenidos a partir de la campaña de maduración por afinidad se analizaron para determinar la unión a CD40 humana y de cyno de la misma manera que la selección *de novo* y se secuenciaron aquellas que mostraron reactividad cruzada.

### **Aislamiento de anticuerpos anti-CD40 mediante el uso de ratas que expresan loci de inmunoglobulina humana**

Los anticuerpos anti-CD40 se generaron mediante el uso de ratas transgénicas que expresan loci de inmunoglobulinas humanas, las OmniRat®; OMT, Inc. Los loci endógenos de inmunoglobulinas de

OmniRat® se reemplazan por loci de Igk e Igλ humanos y un locus de IgH quimérico humano/rata con segmentos V, D y J de origen humano unidos al locus de C<sub>H</sub> de rata. El locus de IgH contiene 22 V<sub>H</sub> humanas, todos los segmentos D y J<sub>H</sub> humanos en su configuración natural unidos al locus de C<sub>H</sub> de rata. La generación y caracterización de las OmniRat® se describe en Osborn, *et al.* J Immunol 190: 1481-1490, 2013; y en la publicación de patente internacional núm. WO 14/093908.

Las cohortes separadas de cinco OmniRats se inmunizaron con CD40 ECD-His recombinante humana y de cyno o con proteínas CD40 ECD-Fc humanas y de cyno. Después de un régimen de inmunización de 31-34 días, los nódulos linfáticos se recolectaron a partir de dos ratas y se usaron para generar hibridomas. Los hibridomas generados se analizaron para determinar la unión a CD40-ECD humana y de cyno. Los hibridomas que presentaban una unión estadísticamente significativa a CD40-ECD humana y también de cyno después de ANOVA de una vía por medio de comparación media del método de Dunnett después de la prueba se clonaron y sus regiones V se secuenciaron usando procedimientos estándar

Las secuencias identificadas a partir de la selección de fagos *de novo* y la inmunización de ratas OMT, y el análisis posterior de sobrenadantes de hibridomas se expresaron como mAbs y Fabs y se analizaron para identificar la actividad antagonista potencial en el ensayo de activación HEK-Blue™ CD40L NF-κB. De las 18 secuencias derivadas de fagos *de novo* expresadas como mAbs, se identificaron 4 mAbs que presentaban actividad antagonista

basada en el criterio de que un antagonista tendrá una señal más baja que 3 x la desviación estándar de la señal media de células HEK-Blue™ CD40L tratadas con rhCD154-ECD-his solo. De los 18 Fabs correspondientes, 15 Fabs se identificaron como antagonistas basados en los mismos criterios. De las 13 secuencias derivadas de hibridomas, 6 mAbs y 8 Fabs correspondientes se identificaron como antagonistas. Por lo tanto, de un total de 31 mAbs y Fabs correspondientes, se identificó que 10 mAbs y 23 Fabs tenían actividad antagonista.

Los 31 mAbs descritos anteriormente se analizaron en el ensayo de activación HEK-Blue™ CD40L NF-κB sin un ligando de CD40 para identificar agonistas potenciales. De las 18 secuencias derivadas de fagos *de novo*, se identificaron 16 mAbs como agonistas basados en el criterio de que un agonista mostrará una señal mayor que 3 x la desviación estándar de la señal media de células HEK-Blue™ CD40L solas. De las 13 secuencias de la genoteca de hibridomas, se identificaron 8 mAbs como agonistas. Por lo tanto, del total de 31 mAbs analizados, se identificó 24 mAbs como agonistas.

### **Ejemplo 3. Anticuerpos anti-CD40 que se unen a CD40 en células**

Se caracterizó aún más los anticuerpos seleccionados que bloquearon la unión de CD154 a CD40 para determinar su unión a varias células que expresan CD40.

Los experimentos se realizaron con los ensayos descritos anteriormente. Se caracterizó aún más 20 anticuerpos basado en su unión a DC humanas, DC de cyno, células Raji y células HEK Blue™ CD40L. La **Tabla 4** muestra los valores de EC<sub>50</sub> para anticuerpos seleccionados para determinar su unión a estas células y la fuente de los anticuerpos (fago o ratas OMT)

**Tabla 4.**

| Anticuerpo | Fuente de anticuerpo | EC <sub>50</sub> (µg/ml) |                    |                 |         |
|------------|----------------------|--------------------------|--------------------|-----------------|---------|
|            |                      | DC humanas maduras       | DC de cyno maduras | HEK-Blue™ CD40L | Raji    |
| C40M9      | OMT                  | 0,1233                   | 0,04507            | 0,09424         | 0,05708 |
| C40M12     | OMT                  | 0,2984                   | 0,04737            | 0,1124          | 0,0299  |
| C40M17     | OMT                  | 0,1274                   | 0,05372            | 0,07505         | 0,07394 |
| C40M18     | OMT                  | 0,352                    | 0,03895            | 0,1262          | 0,07298 |
| C40M51     | Fago                 | 0,4783                   | 0,05439            | 0,128           | 0,04337 |
| C40M55     | Fago                 | 0,1025                   | 0,02182            | 0,06306         | 0,04615 |
| C40M56     | Fago                 | 0,402                    | 0,05652            | 0,1089          | 0,09496 |
| C40M58     | Fago                 | 0,7238                   | 0,07072            | 0,1458          | 0,06109 |
| C40M59     | Fago                 | 0,8261                   | 0,07404            | 0,3536          | 0,1247  |
| C40M62     | Fago                 | 0,3288                   | 0,07157            | 0,2276          | 0,0994  |
| C40M63     | Fago                 | 0,09962                  | 0,03095            | 0,0849          | 0,03957 |
| C40M66     | Fago                 | 0,2024                   | 0,04826            | 0,1688          | 0,07303 |
| C40M67     | Fago                 | 0,7658                   | 0,3269             | 0,5497          | 0,2474  |

#### **Ejemplo 4. Caracterización de los anticuerpos agonistas anti-CD40**

Se probaron anticuerpos para determinar su capacidad para activar células dendríticas humanas primarias y células B en forma dependiente de la reticulación a través de los ensayos descritos anteriormente en presencia o ausencia de reticulador antihumano (F(ab')<sub>2</sub>). La Figura 1 muestra que los anticuerpos seleccionados fueron capaces de activar células B solo en presencia del reticulador, cuando se evaluó la actividad de células B por medio de expresión de superficie de CD23 inducida (**Figura 1A y Figura 1B**) o expresión de superficie de HLA-DR inducida (**Figura 1C y Figura 1D**). La Figura 2 muestra que los anticuerpos seleccionados fueron capaces de activar células DC solo en presencia del reticulador, cuando se evaluó la actividad de DC por medio de expresión de superficie de CD83 inducida (**Figura 2A y Figura 2B**) o expresión de superficie de HLA-DR inducida (**Figura 2C y Figura 2D**). Un anticuerpo de control utilizado en los ensayos induce la activación de células B y DC en una forma independiente de la reticulación (CP-870,893).

Los valores de EC<sub>50</sub> se midieron para cada anticuerpo probado para determinar la inducción de la expresión de superficie de los marcadores de activación de DC CD80, CD83, CD86 y HLA-DR y los marcadores de activación de células B CD23, CD80, CD83, CD86 y HLA-DR. Los anticuerpos que indujeron la expresión de superficie de todos los marcadores de células DC y B probados cuando se reticularon se clasificaron como agonistas. La **Tabla 5** muestra los valores de EC<sub>50</sub> de

anticuerpos seleccionados para determinar su inducción de expresión de superficie de marcadores de activación de células B. La **Tabla 6** muestra los valores de EC<sub>50</sub> para los anticuerpos seleccionados para determinar su inducción de expresión de superficie de marcadores de activación de DC.

**Tabla 5.**

| Anticuerpo | Células B; EC <sub>50</sub> (µg/ml) |            |             |            |             |
|------------|-------------------------------------|------------|-------------|------------|-------------|
|            | CD23                                | CD80       | CD83        | CD86       | HLA-DR      |
| C40M9      | 0,002873                            | 0,01309    | 0,000006678 | 0,00001087 | 0,00001196  |
| C40M11     | 3,132                               | 0,9204     | 0,0208      | 0,01229    | 0,01573     |
| C40M12     | 125,4                               | 0,00623    | 0,002844    | 0,002279   | 0,004273    |
| C40M17     | 0,001948                            | 0,0008786  | 0,0008382   | 0,004572   | 0,001569    |
| C40M18     | 0,3062                              | 0,04806    | 0,06239     | 0,008725   | 0,02386     |
| C40M50     | 1,704                               | 2,034      | 1,574       | 1,991      | 1,741       |
| C40M51     | 0,04479                             | 0,01831    | 0,02592     | 0,01318    | 0,007773    |
| C40M52     | 1,334                               | 0,03019    | 1,481       | 0,007082   | 0,06682     |
| C40M53     | 0,02243                             | 0,04693    | 2,247       | 0,006516   | 0,001178    |
| C40M55     | 0,06162                             | 0,001433   | 0,001252    | 0,0006455  | 0,0004372   |
| C40M56     | 0,01856                             | 0,001414   | 0,001717    | 0,001194   | 0,001054    |
| C40M57     | 0,01587                             | 0,001718   | 0,002085    | 0,002345   | 0,001641    |
| C40M58     | 0,06                                | 0,02164    | 0,007851    | 0,002352   | 0,004678    |
| C40M59     | 1,236                               | 0,01056    | 0,01077     | 0,0154     | 0,004836    |
| C40M60     | 0,02046                             | 0,01714    | 0,001706    | 0,001733   | 0,001091    |
| C40M61     | 0,02809                             | 0,0224     | 0,004731    | 0,006599   | 0,004719    |
| C40M62     | 0,01253                             | 0,001543   | 0,001256    | 0,001135   | 0,0003556   |
| C40M63     | 0,006942                            | 0,00001668 | 0,0005813   | 0,00126    | 0,000009663 |

|                    |                  |          |          |          |          |
|--------------------|------------------|----------|----------|----------|----------|
| C40M66             | 0,04141          | 0,005115 | 0,001818 | 0,002464 | 0,001077 |
| C40M67             | 0,004169         | 0,003323 | 0,001463 | 0,002257 | 0,000792 |
| mAb* de referencia | 0,003172         | 0,007337 | 0,004283 | 0,004042 | 0,008147 |
|                    | *Sin reticulador |          |          |          |          |

**Tabla 6.**

| Anticuerpo | DC, EC <sub>50</sub> (µg/ml) |           |           |             |
|------------|------------------------------|-----------|-----------|-------------|
|            | CD80                         | CD83      | CD86      | HLA-DR      |
| C40M9      | 0,02769                      | 0,03985   | 0,1033    | 0,07974     |
| C40M11     | 0,06097                      | 0,312     | 0,1448    | 0,2191      |
| C40M12     | 0,000003935                  | 0,3324    | 0,5025    | 0,3006      |
| C40M17     | 0,03602                      | 0,3064    | 0,03296   | 1,724E-07   |
| C40M18     | 0,05226                      | 0,04784   | 0,03021   | 0,01047     |
| C40M50     | 0,4765                       | 0,5989    | 0,0001058 | 0,00004135  |
| C40M51     | 0,9675                       | 0,04604   | 0,1281    | 0,05242     |
| C40M52     | 4,207E-11                    | 0,1138    | 0,9492    | 0,128       |
| C40M53     | 1,276                        | 0,03104   | 0,2996    | 0,04803     |
| C40M55     | 0,0616                       | 0,1031    | 0,1981    | 0,08108     |
| C40M56     | 0,05173                      | 0,1068    | 0,1321    | 0,06845     |
| C40M57     | 0,1176                       | 0,04141   | 0,1284    | 0,05546     |
| C40M58     | 0,05236                      | 0,1212    | 0,1149    | 0,000004067 |
| C40M59     | 0,000342                     | 0,2755    | 0,009793  | 0,05356     |
| C40M60     | 0,00001139                   | 0,01384   | 0,04959   | 0,004906    |
| C40M61     | 0,00001339                   | 0,02433   | 0,02089   | 0,001154    |
| C40M62     | 0,6015                       | 0,2184    | 0,3811    | 0,06035     |
| C40M63     | 0,07054                      | 0,0009615 | 0,2583    | 0,1542      |
| C40M66     | 0,1582                       | 0,1746    | 0,4233    | 0,03937     |

|                   |                  |        |        |         |
|-------------------|------------------|--------|--------|---------|
| C40M67            | 0,04994          | 0,127  | 0,2015 | 0,05067 |
| mAb de referencia | 0,04466          | 0,2454 | 0,133  | 0,2417  |
|                   | *Sin reticulador |        |        |         |

Los anticuerpos generados se compararon con el anticuerpo de referencia CP-870,893 para determinar su capacidad para inducir la activación de DC usando cuatro marcadores de superficie de DC. Varios anticuerpos indujeron la expresión de superficie de al menos un marcador de activación de DC (CD80, CD83, CD86, HLA-DR) con un valor de  $EC_{50}$  comparable o menor que el anticuerpo de referencia. En los ensayos, los anticuerpos de CD40 generados se evaluaron en presencia del reticulador, mientras que el anticuerpo de referencia se evaluó en ausencia del reticulador.

Los anticuerpos C40M9 y C40M48 fueron más potentes en la inducción de la expresión de superficie de todos los marcadores de activación de DC evaluados cuando se compararon con el anticuerpo de referencia.

Los anticuerpos C40M18, C40M55 y C40M63 fueron más potentes en la inducción de la expresión de superficie de tres marcadores de activación de DC evaluados cuando se compararon con el anticuerpo de referencia.

Los anticuerpos C40M17, C40M51 y C40M56 fueron más potentes en la inducción de la expresión de superficie de dos marcadores de activación de DC evaluados cuando se compararon con el anticuerpo de referencia.

Los anticuerpos C40M12, C40M62 y C40M66 fueron más potentes en la inducción de la expresión de superficie de un marcador de activación de DC evaluado cuando se compararon con el anticuerpo de referencia.

Los datos experimentales demuestran que varios de los anticuerpos agonistas de CD40 generados fueron más potentes que el anticuerpo de referencia en cuanto a su capacidad para activar células dendríticas. Sobre todo, dado que los anticuerpos generados no fueron capaces de activar DC o células B sin reticulación, se espera que tengan un perfil de seguridad beneficioso cuando se comparan con el anticuerpo de referencia.

#### **Ejemplo 5. Caracterización estructural de anticuerpos de CD40**

El aislamiento de anticuerpos y la secuenciación de las cadenas de polipéptidos se realizaron por medio de métodos estándar. Las secuencias de aminoácidos de HCDR1 de anticuerpos anti-CD40 seleccionados se muestran en la **Tabla 7**.

Las secuencias de aminoácidos de HCDR2 de anticuerpos anti-CD40 seleccionados se muestran en la **Tabla 8**.

Las secuencias de aminoácidos de HCDR3 de anticuerpos anti-CD40 seleccionados se muestran en la **Tabla 9**.

Las secuencias de aminoácidos de LCDR1 de anticuerpos anti-CD40 seleccionados se muestran en la **Tabla 10**.

Las secuencias de aminoácidos de LCDR2 de anticuerpos anti-CD40 seleccionados se muestran en la **Tabla 11**.

Las secuencias de aminoácidos de LCDR3 de anticuerpos anti-CD40 seleccionados se muestran en la **Tabla 12**.

Las secuencias de aminoácidos de VH de anticuerpos anti-CD40 seleccionados se muestran en la **Tabla 13**.

Las secuencias de aminoácidos de VL de anticuerpos anti-CD40 seleccionados se muestran en la **Tabla 14**.

Las secuencias de ADN de VH de anticuerpos anti-CD40 seleccionados se muestran en la **Tabla 15**.

Las secuencias de ADN de VL de anticuerpos anti-CD40 seleccionados se muestran en la **Tabla 16**.

Las secuencias de aminoácidos de cadena pesada de anticuerpos anti-CD40 seleccionados se muestran en la **Tabla 17**.

Las secuencias de ADN de cadena pesada de anticuerpos anti-CD40 seleccionados se muestran en la **Tabla 18**.

Las secuencias de aminoácidos de cadena ligera de anticuerpos anti-CD40 seleccionados se muestran en la **Tabla 19**.

Las secuencias de ADN de cadena ligera de anticuerpos anti-CD40 seleccionados se muestran en la **Tabla 20**.

**Tabla 7.**

| mAb | HCDR1     |                               |
|-----|-----------|-------------------------------|
|     | Secuencia | Secuencia con núm. de ident.: |

|         |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C40M67  | D | Y | A | M | N |   |   | 1 |
| C40M66  | S | Y | A | I | S |   |   | 2 |
| C40M63  | S | Y | A | I | S |   |   | 2 |
| C40M62  | S | Y | A | I | S |   |   | 2 |
| C40M59  | S | Y | W | I | S |   |   | 3 |
| C40M58  | S | Y | A | M | S |   |   | 4 |
| C40M56  | S | Y | A | M | S |   |   | 4 |
| C40M55  | S | Y | A | I | S |   |   | 2 |
| C40M51  | S | Y | A | M | S |   |   | 4 |
| C40M18  | S | Y | A | M | S |   |   | 4 |
| C40M17  | S | Y | A | M | S |   |   | 4 |
| C40M12  | S | Y | A | M | S |   |   | 4 |
| C40M9   | S | S | S | Y | Y | W | G | 5 |
| C40M102 | S | Y | A | M | S |   |   | 4 |
| C40M103 | S | Y | A | M | S |   |   | 4 |
| C40M104 | S | Y | A | M | S |   |   | 4 |
| C40M105 | S | S | S | Y | Y | W | G | 5 |
| C40M121 | S | S | S | Y | Y | W | G | 5 |
| C40M126 | S | S | S | Y | Y | W | G | 5 |

**Tabla 8.**

| mAb    | HCDR2     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | Secuencia<br>con núm.<br>de ident.: |
|--------|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-------------------------------------|
|        | Secuencia |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                     |
| C40M67 | G         | I | K | S | G | G | S | S | K | Y | Y | A | D | S | V | K | G | 8                                   |
| C40M66 | G         | I | I | P | I | F | G | T | A | N | Y | A | Q | K | F | Q | G | 7                                   |
| C40M63 | G         | I | I | P | I | F | G | T | A | N | Y | A | Q | K | F | Q | G | 7                                   |
| C40M62 | G         | I | I | P | I | F | G | T | A | N | Y | A | Q | K | F | Q | G | 7                                   |
| C40M59 | Y         | I | I | P | I | S | G | T | A | R | Y | A | Q | K | F | Q | G | 13                                  |
| C40M58 | A         | I | S | G | S | G | G | S | T | Y | Y | A | D | S | V | K | G | 6                                   |

|         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| C40M56  | A | I | S | G | S | G | G | S | T | Y | Y | A | D | S | V | K | G | 6  |
| C40M55  | G | I | I | P | I | F | G | T | A | N | Y | A | Q | K | F | Q | G | 7  |
| C40M51  | A | I | S | G | S | G | G | S | T | Y | Y | A | D | S | V | K | G | 6  |
| C40M18  | I | I | N | N | N | V | G | R | T | Y | Y | A | D | S | V | K | G | 9  |
| C40M17  | T | I | N | N | S | G | G | G | T | Y | Y | A | D | S | V | K | G | 11 |
| C40M12  | V | I | S | D | S | G | G | R | T | Y | Y | A | D | S | V | K | G | 12 |
| C40M9   | N | I | Y | Y | R | G | D | T | Y | Y | S | P | S | L | K | S |   | 10 |
| C40M102 | I | I | N | N | N | V | G | R | T | Y | Y | A | D | S | V | K | G | 9  |
| C40M103 | I | I | N | N | N | V | G | R | T | Y | Y | A | D | S | V | K | G | 9  |
| C40M104 | I | I | N | N | N | V | G | R | T | Y | Y | A | D | S | V | K | G | 9  |
| C40M105 | N | I | Y | Y | R | G | D | T | Y | Y | S | P | S | L | K | S |   | 10 |
| C40M121 | N | I | Y | Y | R | G | D | T | Y | Y | S | P | S | L | K | S |   | 10 |
| C40M126 | N | I | Y | Y | R | G | D | T | Y | Y | S | P | S | L | K | S |   | 10 |

Tabla 9.

| mAb    | HCDR3     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | Secuencia<br>con núm.<br>de ident.: |
|--------|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-------------------------------------|
|        | Secuencia |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                     |
| C40M67 | H         | V | D | F | Y | R | A | L | D | Y |   |   |   |   |   | 22                                  |
| C40M66 | V         | R | Y | S | A | W | Y | R | D | S | L | D | Y |   |   | 25                                  |
| C40M63 | V         | G | H | P | A | W | W | R | D | S | L | D | Y |   |   | 24                                  |
| C40M62 | V         | A | N | A | A | Y | F | R | S | G | L | D | Y |   |   | 23                                  |
| C40M59 | E         | P | G | Y | S | S | G | L | S | V | D | Y | F | D | Y | 17                                  |
| C40M58 | G         | P | A | Y | T | I | V | F | D | Y |   |   |   |   |   | 19                                  |
| C40M56 | G         | P | V | Y | S | L | V | F | D | Y |   |   |   |   |   | 20                                  |
| C40M55 | D         | G | Y | R | R | Y | G | I | G | R | Y | G | F | D | Y | 14                                  |
| C40M51 | G         | P | V | Y | S | S | V | F | D | Y |   |   |   |   |   | 21                                  |
| C40M18 | E         | G | G | D | Y | Y | Y | Y | G | M | D | V |   |   |   | 15                                  |
| C40M17 | E         | G | G | K | Y | Y | Y | Y | A | M | D | V |   |   |   | 16                                  |
| C40M12 | E         | G | G | D | Y | Y | Y | Y | G | M | D | V |   |   |   | 15                                  |

|         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |  |    |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--|--|--|----|
| C40M9   | G | F | R | F | D | Y |   |   |   |   |   |   |  |  |  | 18 |
| C40M102 | E | G | G | D | Y | Y | Y | Y | G | M | D | V |  |  |  | 15 |
| C40M103 | E | G | G | D | Y | Y | Y | Y | G | M | D | V |  |  |  | 15 |
| C40M104 | E | G | G | D | Y | Y | Y | Y | G | M | D | V |  |  |  | 15 |
| C40M105 | G | F | R | F | D | Y |   |   |   |   |   |   |  |  |  | 18 |
| C40M121 | G | F | R | F | D | Y |   |   |   |   |   |   |  |  |  | 18 |
| C40M126 | G | F | R | F | D | Y |   |   |   |   |   |   |  |  |  | 18 |

**Tabla 10.**

| mAb     | LCDR1     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                     |
|---------|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-------------------------------------|
|         | Secuencia |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | Secuencia<br>con núm.<br>de ident.: |
| C40M67  | R         | A | S | Q | S | V | K | N | S | S | L | A |   |   |   | 28                                  |
| C40M66  | K         | S | S | Q | S | V | L | Y | S | S | N | N | K | N | Y | 26                                  |
| C40M63  | K         | S | S | Q | S | V | L | Y | S | S | N | N | K | N | Y | 26                                  |
| C40M62  | K         | S | S | Q | S | V | L | Y | S | S | N | N | K | N | Y | 26                                  |
| C40M59  | R         | A | S | Q | S | I | S | S | Y | L | N |   |   |   |   | 27                                  |
| C40M58  | R         | A | S | Q | S | I | S | S | Y | L | N |   |   |   |   | 27                                  |
| C40M56  | R         | A | S | Q | S | I | S | S | Y | L | N |   |   |   |   | 27                                  |
| C40M55  | R         | A | S | Q | S | I | S | S | Y | L | N |   |   |   |   | 27                                  |
| C40M51  | R         | A | S | Q | S | I | S | S | Y | L | N |   |   |   |   | 27                                  |
| C40M18  | S         | G | D | K | L | G | D | K | Y | V | C |   |   |   |   | 30                                  |
| C40M17  | S         | G | D | K | L | G | D | K | Y | A | C |   |   |   |   | 29                                  |
| C40M12  | S         | G | D | K | L | G | D | K | Y | V | C |   |   |   |   | 30                                  |
| C40M9   | T         | G | T | S | S | D | V | G | G | Y | N | Y | V | S |   | 32                                  |
| C40M102 | S         | G | D | K | L | G | D | K | Y | V | C |   |   |   |   | 30                                  |
| C40M103 | S         | G | D | K | L | G | D | K | Y | V | S |   |   |   |   | 31                                  |
| C40M104 | S         | G | D | K | L | G | D | K | Y | V | S |   |   |   |   | 31                                  |
| C40M105 | T         | G | T | S | S | D | V | G | G | Y | N | Y | V | S |   | 32                                  |
| C40M121 | T         | G | T | S | S | D | V | G | G | Y | N | Y | V | S |   | 32                                  |

|         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |  |    |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--|--|--|----|
| C40M126 | T | G | T | S | S | D | V | G | G | Y | N | Y | V | S |  |  |  | 32 |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--|--|--|----|

**Tabla 11.**

| mAb     | LCDR2     |   |   |   |   |   |   |                                     |
|---------|-----------|---|---|---|---|---|---|-------------------------------------|
|         | Secuencia |   |   |   |   |   |   | Secuencia<br>con núm.<br>de ident.: |
| C40M67  | T         | A | S | S | R | A | T | 38                                  |
| C40M66  | W         | A | S | T | R | E | S | 39                                  |
| C40M63  | W         | A | S | T | R | E | S | 39                                  |
| C40M62  | W         | A | S | T | R | E | S | 39                                  |
| C40M59  | A         | A | S | S | L | Q | S | 33                                  |
| C40M58  | A         | A | S | S | L | Q | S | 33                                  |
| C40M56  | A         | A | S | S | L | Q | S | 33                                  |
| C40M55  | A         | A | S | S | L | Q | S | 33                                  |
| C40M51  | A         | A | S | S | L | Q | S | 33                                  |
| C40M18  | Q         | D | S | K | R | P | S | 36                                  |
| C40M17  | Q         | D | S | R | R | P | S | 37                                  |
| C40M12  | H         | D | N | K | R | P | S | 35                                  |
| C40M9   | E         | V | S | K | R | P | S | 34                                  |
| C40M102 | Q         | D | S | K | R | P | S | 36                                  |
| C40M103 | Q         | D | S | K | R | P | S | 36                                  |
| C40M104 | Q         | D | S | K | R | P | S | 36                                  |
| C40M105 | E         | V | S | K | R | P | S | 34                                  |
| C40M121 | E         | V | S | K | R | P | S | 34                                  |
| C40M126 | E         | V | S | K | R | P | S | 34                                  |

**Tabla 12.**

| mAb     | LCDR3     |   |   |   |   |   |   |   |   |   | Secuencia<br>con núm.<br>de ident.: |
|---------|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-------------------------------------|
|         | Secuencia |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                     |
| C40M67  | Q         | Q | S | S | A | P | P | W | T |   | 42                                  |
| C40M66  | Q         | Q | Y | Y | S | T | P | L | T |   | 44                                  |
| C40M63  | Q         | Q | Y | Y | S | T | P | L | T |   | 44                                  |
| C40M62  | Q         | Q | Y | Y | S | T | P | L | T |   | 44                                  |
| C40M59  | Q         | Q | S | Y | S | T | P | L | T |   | 43                                  |
| C40M58  | Q         | Q | S | Y | S | T | P | L | T |   | 43                                  |
| C40M56  | Q         | Q | S | Y | S | T | P | L | T |   | 43                                  |
| C40M55  | Q         | Q | S | Y | S | T | P | L | T |   | 43                                  |
| C40M51  | Q         | Q | S | Y | S | T | P | L | T |   | 43                                  |
| C40M18  | Q         | A | W | V | S | S | T | V | V |   | 41                                  |
| C40M17  | Q         | A | W | A | S | S | T | V | V |   | 40                                  |
| C40M12  | Q         | V | W | D | S | S | T | V | V |   | 46                                  |
| C40M9   | S         | S | Y | A | G | S | N | N | L | V | 47                                  |
| C40M102 | Q         | A | W | V | S | S | T | V | V |   | 41                                  |
| C40M103 | Q         | A | W | V | S | S | T | V | V |   | 41                                  |
| C40M104 | Q         | A | W | V | S | S | T | V | V |   | 41                                  |
| C40M105 | S         | S | Y | A | G | S | N | N | L | V | 47                                  |
| C40M121 | S         | S | Y | A | G | S | N | N | L | V | 47                                  |
| C40M121 | S         | S | Y | A | G | S | N | N | L | V | 47                                  |

**Tabla 13.**

| mAb | VH | Secuencia de VH | VH con identificación de secuencia núm.: |
|-----|----|-----------------|------------------------------------------|
|-----|----|-----------------|------------------------------------------|

|        |        |                                                                                                                                                |    |
|--------|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| C40M67 | C40H20 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG<br>FTFSDYAMNWVRQAPGKGLEWVSGI<br>KSGGSSKYYADSVKGRFTISRDN SKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHVDFY<br>RALDYWGQGGLTLTVSS      | 48 |
| C40M66 | C40H21 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG<br>GTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGII<br>PIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTA<br>YMELSSLRSED TAVYYCARVRYS AWY<br>RDSL DYWGQGGLTLTVSS | 49 |
| C40M63 | C40H25 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG<br>GTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGII<br>PIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTA<br>YMELSSLRSED TAVYYCARVGH PAW<br>WRDSL DYWGQGGLTLTVSS | 50 |
| C40M62 | C40H26 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG<br>GTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGII<br>PIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTA<br>YMELSSLRSED TAVYYCARVANA A YF<br>RSGLDYWGQGGLTLTVSS | 51 |
| C40M59 | C40H29 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG<br>GTFSSYWISWVRQAPGQGLEWMGYII<br>PISGTARYAQKFQGRVTITADESTSTA<br>YMELSSLRSED TAVYYCAREPGYSSG<br>LSVDYFDYWGQGGLTLTVSS | 52 |
| C40M58 | C40H30 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG<br>FTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS<br>GSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNT<br>LYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPAYTI<br>VFDYWGQGGLTLTVSS      | 53 |
| C40M56 | C40H32 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS<br>GFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS<br>AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN S<br>KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGP<br>VYSLVFDYWGQGGLTLTVSS      | 54 |
| C40M55 | C40H33 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG<br>GTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGII<br>PIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTA<br>YMELSSLRSED TAVYYCARDGYRRYG<br>IGRYGFDYWGQGGLTLTVSS | 55 |

|         |        |                                                                                                                                            |    |
|---------|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| C40M51  | C40H38 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG<br>GFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS<br>AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN<br>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGP<br>VYSSVFDYWGGQTLTVSS    | 56 |
| C40M18  | C40H48 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG<br>FTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSIIN<br>NNVGRTYYADSVKGRFTISRDN<br>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEGGDYYY<br>YGMDVWGGQTTTVTVSS | 57 |
| C40M17  | C40H46 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG<br>FTFSSYAMSWVRQAPGRGLEWVSTIN<br>NSGGGTYYADSVKGRFTISRDN<br>SKNTLYLHMNSLRAEDTAVYYCAKEGGKYY<br>YYAMDVWGGQTTTVTVSS | 58 |
| C40M12  | C40H45 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG<br>FTFGSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVIS<br>DSGGRTYYADSVKGRFTISR<br>DYSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEGGDYYY<br>YGMDVWGGQTTTVTVSS | 59 |
| C40M9   | C40H43 | QLQLQESGPGLVKPSEILSLTCTVSGG<br>SISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGNIY<br>YRGDTYYSPSLKSRVTISVDTSKNQFS<br>LKLNSVTAADTAVYYCAKGFRFDYWG<br>QGTLTVTVSS       | 60 |
| C40M102 | C40H48 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG<br>FTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSIIN<br>NNVGRTYYADSVKGRFTISRDN<br>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEGGDYYY<br>YGMDVWGGQTTTVTVSS | 57 |
| C40M103 | C40H48 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG<br>FTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSIIN<br>NNVGRTYYADSVKGRFTISRDN<br>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEGGDYYY<br>YGMDVWGGQTTTVTVSS | 57 |
| C40M104 | C40H48 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG<br>FTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSIIN<br>NNVGRTYYADSVKGRFTISRDN<br>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEGGDYYY<br>YGMDVWGGQTTTVTVSS | 57 |

|         |        |                                                                                                                                      |    |
|---------|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| C40M105 | C40H52 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG<br>GSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIG<br>NIYYRGDTYYSPSLKSRVTISVDTSKN<br>QFSLKLSSVTAADTAVYYCARGFRFD<br>YWGQGTTLTVSS | 61 |
| C40M121 | C40H53 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG<br>GSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIG<br>NIYYRGDTYYSPSLKSRVTISVDTSKN<br>QFSLKLSSVTAADTAVYYCAKGFRFD<br>YWGQGTTLTVSS | 62 |
| C40M126 | C40H53 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG<br>GSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIG<br>NIYYRGDTYYSPSLKSRVTISVDTSKN<br>QFSLKLSSVTAADTAVYYCAKGFRFD<br>YWGQGTTLTVSS | 62 |

**Tabla 14.**

| mAb    | VL     | Secuencia de VL                                                                                                                   | VL con<br>identificación<br>de secuencia<br>núm.: |
|--------|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| C40M67 | C40L10 | EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRAS<br>QSVKNSSLAWYQQKPGQAPRLIYT<br>ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS<br>RLEPEDFAVYYCQQSSAPPWTFGQ<br>GTKVEIK      | 63                                                |
| C40M66 | PH9L2  | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS<br>QSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPP<br>KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGT<br>DFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTP<br>LTFGQGGTKVEIK | 64                                                |
| C40M63 | PH9L2  | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS<br>QSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPP<br>KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGT<br>DFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTP<br>LTFGQGGTKVEIK | 64                                                |
| C40M62 | PH9L2  | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS<br>QSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPP<br>KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGT                                               | 64                                                |

|        |        |                                                                                                                            |    |
|--------|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|        |        | DFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTP<br>LTFGQGTKVEIK                                                                                 |    |
| C40M59 | PH9L4  | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ<br>SISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL<br>QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE<br>DFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK    | 65 |
| C40M58 | PH9L4  | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ<br>SISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL<br>QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE<br>DFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK    | 65 |
| C40M56 | PH9L4  | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ<br>SISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL<br>QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE<br>DFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK    | 65 |
| C40M55 | PH9L4  | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ<br>SISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL<br>QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE<br>DFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK    | 65 |
| C40M51 | PH9L4  | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ<br>SISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL<br>QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE<br>DFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK    | 65 |
| C40M18 | C40L64 | SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDK<br>LGDKYVCWYQQKPGQSPVVVIYQD<br>SKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISG<br>TQAMDEAYYICQAWVSSTVVFGGG<br>TKLTVL | 66 |
| C40M17 | C40L63 | SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDK<br>LGDKYACWYQQKPGQSPVLVIYQDS<br>RRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGT<br>QAMDEADYYCQAWASSTVVFGGGT<br>KLTVL | 67 |
| C40M12 | C40L62 | SYELTQPPSVSVSPGQTASIICSGDK<br>LGDKYVCWYQQKPGQSPVVVIYHD<br>NKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISG<br>TQAMDEADYYCQVWDSSTVVFGGG<br>TKLTVL | 68 |
| C40M9  | BCML12 | QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGT<br>SSDVGGYNYVSWYQQHHPGKAPKLM<br>IYEVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTAS                                        | 69 |

|         |        |                                                                                                                                |    |
|---------|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|         |        | LTVSGLQAEDEADYYCSSYAGSNNL<br>VFGGGTKLTVL                                                                                       |    |
| C40M102 | C40L70 | SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDK<br>LGDKYVCWYQQKPGQSPVLVIYQDS<br>KRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGT<br>QAMDEADYYCQAWVSSTVVFGGGT<br>KLTVL     | 70 |
| C40M103 | C40L69 | SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDK<br>LGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYQDS<br>KRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGT<br>QAMDEADYYCQAWVSSTVVFGGGT<br>KLTVL     | 71 |
| C40M104 | C40L68 | SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDK<br>LGDKYVSWYQQKPGQSPVVVIYQDS<br>KRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGT<br>QAMDEAYYYCQAWVSSTVVFGGGT<br>KLTVL     | 72 |
| C40M105 | BCML12 | QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGT<br>SSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLM<br>IYEVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTAS<br>LTVSGLQAEDEADYYCSSYAGSNNL<br>VFGGGTKLTVL | 69 |
| C40M121 | BCML12 | QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGT<br>SSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLM<br>IYEVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTAS<br>LTVSGLQAEDEADYYCSSYAGSNNL<br>VFGGGTKLTVL | 69 |
| C40M126 | BCML12 | QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGT<br>SSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLM<br>IYEVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTAS<br>LTVSGLQAEDEADYYCSSYAGSNNL<br>VFGGGTKLTVL | 69 |

**Tabla 15.**

| mAb | ADN de VH | ADN de<br>VH de la<br>sec. con<br>núm. de<br>ident.: |
|-----|-----------|------------------------------------------------------|
|-----|-----------|------------------------------------------------------|

|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| C40M67 | GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCGGCCT<br>GGTGCAGCCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCT<br>GCGCGGCGAGCGGCTTTACCTTTAGCGACTATG<br>CGATGAACTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAA<br>GGCCTGGAATGGGTGAGCGGGATCAAGAGCGG<br>CGGTAGCTCCAAATATTATGCGGATAGCGTGAAA<br>GGCCGCTTTACCATTAGCCGCGATAACAGCAAAA<br>ACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGC<br>GGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGAAACAC<br>GTTGACTTTTATAGGGCCTTGGACTATTGGGGCC<br>AGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC                    | 89 |
| C40M66 | CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGT<br>GAAAAAACC GGCGAGCAGCGTGAAAGTGAGCTG<br>CAAAGCGAGCGGCGGCACCTTTAGCAGCTATGC<br>GATTAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGGCCAGG<br>GCCTGGAATGGATGGGCGGCATTATTCCGATTTT<br>TGGCACCGCGAACTATGCGCAGAAATTT CAGGG<br>CCGCGTGACCATTACCGCGGATGAAAGCACCCAG<br>CACCGCGTATATGGA ACTGAGCAGCCTGCGCAG<br>CGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGTT<br>CGGTATTCGGCGTG GTATAGGGACTCTTTGGACT<br>ATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTCTCGA<br>GT | 90 |
| C40M63 | CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGT<br>GAAAAAACC GGCGAGCAGCGTGAAAGTGAGCTG<br>CAAAGCGAGCGGCGGCACCTTTAGCAGCTATGC<br>GATTAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGGCCAGG<br>GCCTGGAATGGATGGGCGGCATTATTCCGATTTT<br>TGGCACCGCGAACTATGCGCAGAAATTT CAGGG<br>CCGCGTGACCATTACCGCGGATGAAAGCACCCAG<br>CACCGCGTATATGGA ACTGAGCAGCCTGCGCAG<br>CGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGTA<br>GGCCATCCGGCTTGGTGGCGTGATT CGTTGGAC<br>TATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGC<br>AGC | 91 |
| C40M62 | CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGT<br>GAAAAAACC GGCGAGCAGCGTGAAAGTGAGCTG<br>CAAAGCGAGCGGCGGCACCTTTAGCAGCTATGC<br>GATTAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGGCCAGG<br>GCCTGGAATGGATGGGCGGCATTATTCCGATTTT<br>TGGCACCGCGAACTATGCGCAGAAATTT CAGGG<br>CCGCGTGACCATTACCGCGGATGAAAGCACCCAG<br>CACCGCGTATATGGA ACTGAGCAGCCTGCGCAG<br>CGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGTT                                                                                    | 92 |

|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|        | GCCAACGCTGCGTATTTTAGGTCTGGCTTGGACT<br>ATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCA<br>GC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
| C40M59 | CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAG<br>TGAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGC<br>TGCAAAGCGAGCGGCGGCACCTTCAGCTCCTA<br>CTGGATTAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGC<br>CAGGGCCTGGAATGGATGGGCTACATTATTCC<br>GATCAGTGGCACTGCCCCGCTACGCGCAGAAAT<br>TTCAGGGCCGCGTGACCATTACCGCTGATGAA<br>AGCACCAGCACCGCGTATATGGAAGTGAGCAG<br>CCTGCGCAGCGAAGATAACCGCGGTGTATTATT<br>GCGCGCGCGAACCAGGCTACAGTAGTGGCCTG<br>AGCGTTGACTACTTTGATTACTGGGGCCAGGG<br>CACCTGGTGACAGTCTCGAGT | 93 |
| C40M58 | GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCGGCCT<br>GGTGCAGCCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCT<br>GCGCGGCGAGCGGCTTTACCTTTAGCAGCTATG<br>CGATGAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAA<br>GGCCTGGAATGGGTGAGCGCGATCAGCGGCTC<br>CGGTGGCTCCACATATTATGCGGATAGCGTGAA<br>AGGCCGCTTTACCATTTACGAGATAACAGCAA<br>AAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCG<br>CGCGGAAGATAACCGCGGTGTATTATTGCGCGC<br>GCGGTCCAGCATACACTATCGTTTTTTGATTATTG<br>GGGCCAGGGCACCTGGTGACAGTCTCGAGT                     | 94 |
| C40M56 | GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCGGCCT<br>GGTGCAGCCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCT<br>GCGCGGCGAGCGGCTTTACCTTTAGCAGCTATG<br>CGATGAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAA<br>GGCCTGGAATGGGTGAGCGCGATCAGCGGCTC<br>CGGTGGCTCCACATATTATGCGGATAGCGTGAA<br>AGGCCGCTTTACCATTTACGAGATAACAGCAA<br>AAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCG<br>CGCGGAAGATAACCGCGGTGTATTATTGCGCGC<br>GCGGTCCTGTTTATTCTCTGGTTTTTTGACTACTG<br>GGGCCAGGGCACCTGGTGACAGTCTCGAGT                     | 95 |
| C40M55 | CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAG<br>TGAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGC<br>TGCAAAGCGAGCGGCGGCACCTTCAGCAGCTA<br>TGCGATTAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGC<br>CAGGGCCTGGAATGGATGGGCGGCATTATTCC<br>GATTTTTGGCACCGCTAACTACGCGCAGAAATT                                                                                                                                                                                                               | 96 |

|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |     |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|        | TCAGGGCCGCGTGACCATTACCGCTGATGAAA<br>GCACCAGCACCGCGTATATGGAAGTGAAGCAGC<br>CTGCGCAGCGAAGATACCGCGGTGTATTATTG<br>CGCGCGCGATGGTTATCGGCGGTATGGCATCG<br>GTCGTTACGGTTTCGATTATTGGGGCCAGGGC<br>ACCCTGGTGACAGTCTCGAGT                                                                                                                                                                                                                |     |
| C40M51 | GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCGGCCT<br>GGTGCAGCCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCT<br>GCGCGGCGAGCGGCTTTACCTTTAGCAGCTATG<br>CGATGAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAA<br>GGCCTGGAATGGGTGAGCGCGATCAGCGGCTCC<br>GGTGGCTCCACATATTATGCGGATAGCGTGAAAG<br>GCCGCTTTACCATTTACGAGATAACAGCAAAAA<br>CACCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGC<br>GGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGG<br>CCCAGTTTATTCTAGCGTTTTTCGACTATTGGGGC<br>CAGGGCACCTGGTGACAGTCTCGAGT               | 97  |
| C40M18 | GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGAGGACTG<br>GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGT<br>GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGCT<br>ATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGCAAGGGA<br>CTGGAATGGGTGTCCATCATCAACAACAACGTGG<br>GCCGGACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCA<br>GATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACAC<br>CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGA<br>GGACACCGCCGTGTACTATTGTGCCAAAGAGGG<br>CGGCGATTACTACTACTACGGCATGGACGTGTGG<br>GGCCAGGGCACCAACCGTGACAGTGTCATCT    | 98  |
| C40M17 | GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGAGGACT<br>GGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTG<br>TGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGC<br>TATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGCAGAG<br>GACTCGAGTGGGTGTCCACCATCAACAACAGCG<br>GCGGAGGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAG<br>GGCAGATTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAG<br>AACACCCTGTACCTGCACATGAACAGCCTGCGG<br>GCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGCCAAA<br>GAGGGCGGCAAGTACTACTACTATGCCATGGAC<br>GTGTGGGGCCAGGGCACCAACCGTGACAGTGTC<br>ATCT | 99  |
| C40M12 | GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGAGGACT<br>GGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTG<br>TGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCGGCAGCTACGC                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 100 |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |     |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|         | TATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAGG<br>GACTGGAATGGGTGTCCGTGATCAGCGACAGCG<br>GCGGCAGAACCTACTACGCCGACAGCGTGAAG<br>GGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACTACAGCAAG<br>AACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGG<br>GCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGCCAAA<br>GAGGGCGGCGATTACTACTACTACGGCATGGAC<br>GTGTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTC<br>ATCT                                                                                                                |     |
| C40M9   | CAGCTCCAGCTGCAGGAATCTGGCCCTGGCCT<br>GGTCAAGCCCAGCGAGATCCTGAGCCTGACCT<br>GTACCGTGTCCGGCGGCAGCATCAGCAGCAGC<br>TCTTACTACTGGGGCTGGATCCGGCAGCCTCCC<br>GGCAAGGGACTGGAATGGATCGGCAACATCTA<br>CTACCGGGGGCGACACCTACTACAGCCCCAGCC<br>TGAAGTCCAGAGTGACCATCAGCGTGGACACCA<br>GCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAACAGCG<br>TGACAGCCGCCGACACCGCCGTGTACTACTGC<br>GCCAAGGGCTTCAGATTGATTACTGGGGCCAG<br>GGCACCTGGTCACCGTGTCATCT                     | 101 |
| C40M102 | GAGGTGCAGCTGGTGGGAATCTGGCGGAGGACT<br>GGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTG<br>TGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGC<br>TATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAGG<br>GACTGGAATGGGTGTCCATCATCAACAACAACG<br>TGGGCCGGACCTACTACGCCGACAGCGTGAAG<br>GGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAG<br>AACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGG<br>GCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGCCAAA<br>GAGGGCGGCGATTACTACTACTACGGCATGGAC<br>GTGTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTC<br>ATCT | 98  |
| C40M103 | GAGGTGCAGCTGGTGGGAATCTGGCGGAGGACTG<br>GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGT<br>GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGCT<br>ATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAGGGA<br>CTGGAATGGGTGTCCATCATCAACAACAACGTGG<br>GCCGGACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCA<br>GATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACAC<br>CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGA<br>GGACACCGCCGTGTACTATTGTGCCAAAGAGGG<br>CGGCGATTACTACTACTACGGCATGGACGTGTGG<br>GGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTCATCT     | 98  |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |     |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| C40M104 | GAGGTGCAGCTGGTGGGAATCTGGCGGAGGACTG<br>GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGT<br>GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGCT<br>ATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGCAAGGGA<br>CTGGAATGGGTGTCCATCATCAACAACAACGTGG<br>GCCGGACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCA<br>GATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACAC<br>CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGA<br>GGACACCGCCGTGTACTATTGTGCCAAAGAGGG<br>CGGCGATTACTACTACTACGGCATGGACGTGTGG<br>GGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTCTATCT | 98  |
| C40M105 | CAGCTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCCGGCCT<br>GGTGAAGCCCAGCGAGACCCTGAGCCTGACCTG<br>CACCGTGAGCGGCGGCAGCATCAGCAGCAGCAG<br>CTACTACTGGGGCTGGATCCGGCAGCCCCCGG<br>CAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAACATCTACTA<br>CCGGGGCGACACCTACTACAGCCCCAGCCTGAA<br>GAGCCGGGTGACCATCAGCGTGGACACCAGCAA<br>GAACCAAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGAC<br>CGCCGCCGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCG<br>GGGCTTCCGGTTCGACTACTGGGGCCAGGGCAC<br>CCTGGTGACCGTGAGCAGC                   | 102 |
| C40M121 | CAGCTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCCGGCCT<br>GGTGAAGCCCAGCGAGACCCTGAGCCTGACCTG<br>CACCGTGAGCGGCGGCAGCATCAGCAGCAGCAG<br>CTACTACTGGGGCTGGATCCGGCAGCCCCCGG<br>CAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAACATCTACTA<br>CCGGGGCGACACCTACTACAGCCCCAGCCTGAA<br>GAGCCGGGTGACCATCAGCGTGGACACCAGCAA<br>GAACCAAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGAC<br>CGCCGCCGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAA<br>GGGCTTCCGGTTCGACTACTGGGGCCAGGGCAC<br>CCTGGTGACCGTGAGCAGC                   | 103 |
| C40M126 | CAGCTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCCGGCCT<br>GGTGAAGCCCAGCGAGACCCTGAGCCTGACCTG<br>CACCGTGAGCGGCGGCAGCATCAGCAGCAGCAG<br>CTACTACTGGGGCTGGATCCGGCAGCCCCCGG<br>CAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAACATCTACTA<br>CCGGGGCGACACCTACTACAGCCCCAGCCTGAA<br>GAGCCGGGTGACCATCAGCGTGGACACCAGCAA<br>GAACCAAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGAC<br>CGCCGCCGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAA<br>GGGCTTCCGGTTCGACTACTGGGGCCAGGGCAC<br>CCTGGTGACCGTGAGCAGC                   | 103 |

Tabla 16.

| mAb    | ADN de VL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | ADN de VL de la sec. con núm. de ident.: |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| C40M67 | GAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCCGGGCACCCTG<br>AGCCTGAGCCCCGGGCGAACGCGCGACCCTGAG<br>CTGCCGCGCGAGCCAGAGCGTTAAAAATAGCAG<br>TCTGGCGTGGTATCAGCAGAAACCGGGCCAGGC<br>GCCGCGCCTGCTGATTTATACTGCGAGCAGCCG<br>CGCGACCGGCATTCCGGATCGCTTTAGCGGCAG<br>CGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCATTAGC<br>CGCCTGGAACCGGAAGATTTTGCGGTGTATTATT<br>GCCAGCAGTCCTCCGCACCTCCGTGGACTTTTG<br>GCCAGGGCACCAAAGTGGAATTAAA                    | 104                                      |
| C40M66 | GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGACAGCCT<br>GGCCGTGAGCCTGGGCGAGCGGGCCACCATC<br>AACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGCTGTACAG<br>CAGCAACAACAAGAACTACCTGGCCTGGTACC<br>AGCAGAAGCCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTG<br>ATCTACTGGGCCAGCACCCGGGAGAGCGGCGT<br>GCCCGACCGGTTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGC<br>ACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCA<br>GGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACTGCCAGC<br>AGTACTACAGCACCCCCCTGACCTTCGGCCAG<br>GGCACCAAGGTGGAGATCAAG | 105                                      |
| C40M63 | GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGACAGCCT<br>GGCCGTGAGCCTGGGCGAGCGGGCCACCATCA<br>ACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGCTGTACAGC<br>AGCAACAACAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAG<br>CAGAAGCCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGAT<br>CTACTGGGCCAGCACCCGGGAGAGCGGCGTGC<br>CCGACCGGTTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACC<br>GACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCC<br>GAGGACGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTA<br>CTACAGCACCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGCA<br>CCAAGGTGGAGATCAAG | 105                                      |
| C40M62 | GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGACAGCCT<br>GGCCGTGAGCCTGGGCGAGCGGGCCACCATCA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 105                                      |

|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |     |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|        | ACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGCTGTACAGC<br>AGCAACAACAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAG<br>CAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGAT<br>CTACTGGGCCAGCACCCGGGAGAGCGGCGTGC<br>CCGACCGGTTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACC<br>GACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCC<br>GAGGACGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTA<br>CTACAGCACCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGCA<br>CCAAGGTGGAGATCAAG                                                   |     |
| C40M59 | GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCT<br>GAGCGCCAGCGTGGGCGACCGGGTGACCATCA<br>CCTGCCGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTAC<br>CTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGC<br>CCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAGCC<br>TGCAGAGCGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGC<br>AGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCAT<br>CAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCT<br>ACTACTGCCAGCAGAGCTACAGCACCCCCCTGA<br>CCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAG | 106 |
| C40M58 | GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCT<br>GAGCGCCAGCGTGGGCGACCGGGTGACCATCA<br>CCTGCCGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTAC<br>CTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGC<br>CCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAGCC<br>TGCAGAGCGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGC<br>AGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCAT<br>CAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCT<br>ACTACTGCCAGCAGAGCTACAGCACCCCCCTGA<br>CCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAG | 106 |
| C40M56 | GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCT<br>GAGCGCCAGCGTGGGCGACCGGGTGACCATCA<br>CCTGCCGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTAC<br>CTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGC<br>CCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAGCC<br>TGCAGAGCGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGC<br>AGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCAT<br>CAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCT<br>ACTACTGCCAGCAGAGCTACAGCACCCCCCTGA<br>CCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAG | 106 |
| C40M55 | GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCT<br>GAGCGCCAGCGTGGGCGACCGGGTGACCATCA<br>CCTGCCGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTAC<br>CTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGC                                                                                                                                                                                                                          | 106 |

|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |     |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|        | CCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAGCC<br>TGCAGAGCGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGC<br>AGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCAT<br>CAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCT<br>ACTACTGCCAGCAGAGCTACAGCACCCCCCTGA<br>CCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAG                                                                                                                                                  |     |
| C40M51 | GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCT<br>GAGCGCCAGCGTGCGGCGACCGGGTGACCATCA<br>CCTGCCGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTAC<br>CTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGC<br>CCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAGCC<br>TGCAGAGCGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGC<br>AGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCAT<br>CAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCT<br>ACTACTGCCAGCAGAGCTACAGCACCCCCCTGA<br>CCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAG | 106 |
| C40M18 | TCCTACGAGCTGACCCAGCCTCCCTCCGTGTCT<br>GTGTCTCCTGGCCAGACCGCCAGCATCACCTGT<br>AGCGGCGACAAGCTGGGCGACAAATACGTGTG<br>CTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCG<br>TGGTGATCATCTACCAGGACAGCAAGAGGCCC<br>AGCGGCATCCCCGAGAGATTCAGCGGCAGCAA<br>CAGCGGCAATACCGCCACCCTGACCATCAGCG<br>GCACCCAGGCCATGGACGAGGCCTACTACTACT<br>GCCAGGCTTGGGTGTCCAGCACCGTGCGTGT<br>GGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCTG      | 107 |
| C40M17 | TCCTACGAGCTGACCCAGCCTCCCTCCGTGTCT<br>GTGTCTCCTGGCCAGACCGCCAGCATCACCTGT<br>AGCGGCGACAAGCTGGGCGATAAGTACGCCTG<br>CTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCG<br>TGCTGGTCATCTACCAGGACAGCAGAAGGCCCA<br>GCGGCATCCCCGAGAGATTCAGCGGCAGCAAC<br>AGCGGCAATACCGCCACCCTGACCATCAGCGG<br>CACCCAGGCCATGGACGAGGCCGATTACTATTG<br>TCAGGCCTGGGCCAGCAGCACCGTGCGTGT<br>GCGGCGGAACAAAGCTGACCGTGCTG       | 108 |
| C40M12 | TCCTACGAGCTGACCCAGCCTCCCTCCGTGTCT<br>GTGTCTCCTGGCCAGACCGCCAGCATCATCTGC<br>AGCGGCGACAAGCTGGGCGACAAATACGTGTG<br>CTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCG<br>TGGTGATCATCTACCACGACAACAAGAGGCCCA<br>GCGGCATCCCCGAGAGATTCAGCGGCAGCAAC<br>AGCGGCAATACCGCCACCCTGACCATCAGCGG                                                                                                            | 109 |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|         | CACCCAGGCCATGGACGAGGCCGACTACTACT<br>GCCAGGTCTGGGACAGCAGCACCGTGGTGTTT<br>GGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCTG                                                                                                                                                                                                                                                                             |     |
| C40M9   | CAGTCTGCCCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCT<br>GGCTCTCCTGGCCAGAGCGTGACCATCAGCTGT<br>ACCGGCACCAGCTCCGACGTGGGCGGCTACAAC<br>TACGTGTCCTGGTATCAGCAGCACCCCGGCAAG<br>GCCCCTAAGCTGATGATCTACGAGGTGTCCAAGC<br>GGCCCAGCGGCGTGCCAGATAGATTCAGCGGCA<br>GCAAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTGACAGTGT<br>CTGGACTGCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACT<br>ACTGTAGCAGCTACGCCGGCAGCAACAACCTGG<br>TGTTGCGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCTG | 110 |
| C40M102 | AGCTACGAGCTGACCCAGCCCCCAGCGTGAG<br>CGTGAGCCCCGGCCAGACCGCCAGCATCACCT<br>GCAGCGGCGACAAGCTGGGCGACAAGTACGTG<br>TGCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCC<br>CGTGCTGGTGATCTACCAGGACAGCAAGCGGC<br>CCAGCGGCATCCCCGAGCGGTTTACGCGGCAGC<br>AACAGCGGCAACACCGCCACCCTGACCATCAG<br>CGGCACCCAGGCCATGGACGAGGCCGACTACT<br>ACTGCCAGGCCTGGGTGAGCAGCACCGTGGTG<br>TTCGGCGGCGGCACCAAGCTGACCGTGCTG              | 111 |
| C40M103 | AGCTACGAGCTGACCCAGCCCCCAGCGTGAG<br>CGTGAGCCCCGGCCAGACCGCCAGCATCACCT<br>GCAGCGGCGACAAGCTGGGCGACAAGTACGTG<br>AGCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCC<br>CGTGCTGGTGATCTACCAGGACAGCAAGCGGC<br>CCAGCGGCATCCCCGAGCGGTTTACGCGGCAGC<br>AACAGCGGCAACACCGCCACCCTGACCATCAG<br>CGGCACCCAGGCCATGGACGAGGCCGACTACT<br>ACTGCCAGGCCTGGGTGAGCAGCACCGTGGTG<br>TTCGGCGGCGGCACCAAGCTGACCGTGCTG              | 112 |
| C40M104 | AGCTACGAGCTGACCCAGCCCCCAGCGTGAG<br>CGTGAGCCCCGGCCAGACCGCCAGCATCACCT<br>GCAGCGGCGACAAGCTGGGCGACAAGTACGTG<br>AGCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCC<br>CGTGGTGGTGATCTACCAGGACAGCAAGCGGC<br>CCAGCGGCATCCCCGAGCGGTTTACGCGGCAGC<br>AACAGCGGCAACACCGCCACCCTGACCATCAG<br>CGGCACCCAGGCCATGGACGAGGCCTACTACT<br>ACTGCCAGGCCTGGGTGAGCAGCACCGTGGTG<br>TTCGGCGGCGGCACCAAGCTGACCGTGCTG              | 113 |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| C40M105 | CAGTCTGCCCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCT<br>GGCTCTCCTGGCCAGAGCGTGACCATCAGCTGT<br>ACCGGCACCAGCTCCGACGTGGGCGGCTACAAC<br>TACGTGTCCTGGTATCAGCAGCACCCCGGCAAG<br>GCCCCTAAGCTGATGATCTACGAGGTGTCCAAGC<br>GGCCCAGCGGCGTGCCAGATAGATTTCAGCGGCA<br>GCAAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTGACAGTGT<br>CTGGACTGCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACT<br>ACTGTAGCAGCTACGCCGGCAGCAACAACCTGG<br>TGTTCCGGCGGAGGACCAAGCTGACCGTGCTG | 110 |
| C40M121 | CAGTCTGCCCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCT<br>GGCTCTCCTGGCCAGAGCGTGACCATCAGCTGT<br>ACCGGCACCAGCTCCGACGTGGGCGGCTACAAC<br>TACGTGTCCTGGTATCAGCAGCACCCCGGCAAG<br>GCCCCTAAGCTGATGATCTACGAGGTGTCCAAGC<br>GGCCCAGCGGCGTGCCAGATAGATTTCAGCGGCA<br>GCAAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTGACAGTGT<br>CTGGACTGCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACT<br>ACTGTAGCAGCTACGCCGGCAGCAACAACCTGG<br>TGTTCCGGCGGAGGACCAAGCTGACCGTGCTG | 110 |
| C40M126 | CAGTCTGCCCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCT<br>GGCTCTCCTGGCCAGAGCGTGACCATCAGCTGT<br>ACCGGCACCAGCTCCGACGTGGGCGGCTACAAC<br>TACGTGTCCTGGTATCAGCAGCACCCCGGCAAG<br>GCCCCTAAGCTGATGATCTACGAGGTGTCCAAGC<br>GGCCCAGCGGCGTGCCAGATAGATTTCAGCGGCA<br>GCAAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTGACAGTGT<br>CTGGACTGCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACT<br>ACTGTAGCAGCTACGCCGGCAGCAACAACCTGG<br>TGTTCCGGCGGAGGACCAAGCTGACCGTGCTG | 110 |

**Tabla 17.**

| mAb    | Aminoácido de HC                                                                                                                                                                                                                         | Sec. con<br>núm. de<br>ident. HC: |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| C40M67 | EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAM<br>NWVRQAPGKGLEWVSGIKSGGSSKYYADSVKGRF<br>TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHVDFY<br>RALDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS<br>GGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFP<br>AVLQSSGLYSLSSVTV PSSLGTQTYICNVNHKPS | 114                               |

|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |     |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|        | NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL<br>FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW<br>YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD<br>WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE<br>SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
| C40M66 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIS<br>WVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTI<br>TADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARVRYSAWY<br>RDSL DYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKST<br>SGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTF<br>PAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKP<br>SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF<br>LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN<br>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH<br>QDWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE<br>PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  | 115 |
| C40M63 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIS<br>WVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTI<br>TADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARVGHPAW<br>WRDSL DYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSK<br>STSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVH<br>TFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNH<br>KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS<br>VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF<br>N WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL<br>HQDWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR<br>EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | 116 |
| C40M62 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIS<br>WVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTI<br>TADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARVANAAYF<br>RSGLDYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKST<br>SGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTF<br>PAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKP<br>SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF<br>LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN<br>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH<br>QDWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE<br>PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE                                                                              | 117 |

|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|        | WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |     |
| C40M59 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYWI<br>SWVRQAPGQGLEWMGYIIPISGTARYAQKFQGRVT<br>ITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAREPGYSS<br>GLSVDYFDYWGGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSS<br>KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV<br>HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN<br>HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP<br>SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK<br>FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL<br>HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR<br>EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | 118 |
| C40M58 | EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYAMS<br>WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI<br>SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDNAVYYCARGPAYTIV<br>FDYWGGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG<br>TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV<br>LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT<br>KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP<br>PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV<br>DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW<br>LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY<br>TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK    | 119 |
| C40M56 | EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYAMS<br>WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI<br>SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDNAVYYCARGPVYSLV<br>FDYWGGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG<br>TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV<br>LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT<br>KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP<br>PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV<br>DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW<br>LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY<br>TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK    | 120 |
| C40M55 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI<br>SWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 121 |

|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |     |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|        | TADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYRRYG<br>IGRYGFDYWGGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK<br>STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH<br>TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH<br>KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS<br>VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF<br>NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL<br>HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR<br>EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                            |     |
| C40M51 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS<br>WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI<br>SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPVYSSV<br>FDYWGGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG<br>TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV<br>LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT<br>KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP<br>PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV<br>DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW<br>LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY<br>TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK   | 122 |
| C40M18 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM<br>SWVRQAPGKGLEWVSIINNNVGRTYYADSVKGRFT<br>ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEGGDYY<br>YYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS<br>TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT<br>FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK<br>PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV<br>FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN<br>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH<br>QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE<br>PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | 123 |
| C40M17 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM<br>SWVRQAPGRGLEWVSTINNSGGGTYYADSVKGRF<br>TISRDNSKNTLYLHMNSLRAEDTAVYYCAKEGGKY<br>YYYAMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK<br>STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH<br>TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH<br>KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS                                                                                                                                                                                                                                       | 124 |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |     |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|         | VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF<br>NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL<br>HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR<br>EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                                                                                                                                                |     |
| C40M12  | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYAM<br>SWVRQAPGKGLEWVSVISDSGGRTYYADSVKGRF<br>TISRDYSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEGGDY<br>YYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK<br>STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH<br>TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH<br>KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS<br>VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF<br>NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL<br>HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR<br>EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | 125 |
| C40M9   | QLQLQESGPGLVKPSLILSLTCTVSGGSISSSSYW<br>GWIRQPPGKGLEWIGNIYYRGDTYYSPSLKSRVTIS<br>VDTSKNQFSLKLNSVTAADTAVYYCAKGFREFDYWG<br>QGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG<br>CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG<br>LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK<br>VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD<br>TLNISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWWYVDGVEV<br>HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS<br>REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPN<br>NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS<br>CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK       | 126 |
| C40M102 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM<br>SWVRQAPGKGLEWVSIINNNVGRTYYADSVKGRFT<br>ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEGGDY<br>YYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS<br>TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT<br>FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK<br>PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV<br>FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN<br>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH<br>QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE<br>PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE                                                                              | 123 |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |     |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|         | WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |     |
| C40M103 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM<br>SWVRQAPGKGLEWVSIINNNVGRTYYADSVKGRFT<br>ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEGGDYY<br>YYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS<br>TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT<br>FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK<br>PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV<br>FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN<br>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH<br>QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE<br>PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | 123 |
| C40M104 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM<br>SWVRQAPGKGLEWVSIINNNVGRTYYADSVKGRFT<br>ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEGGDYY<br>YYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS<br>TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT<br>FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK<br>PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV<br>FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN<br>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH<br>QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE<br>PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | 123 |
| C40M105 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYY<br>WGWIRQPPGKGLEWIGNIYYRGDTYYSPSLKSRVT<br>ISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGFRFDY<br>WGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA<br>LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS<br>SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD<br>KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP<br>KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG<br>KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>P<br>SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP<br>ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN<br>VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  | 127 |
| C40M121 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYY<br>WGWIRQPPGKGLEWIGNIYYRGDTYYSPSLKSRVT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 128 |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |     |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|         | ISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAKGFRFDY<br>WGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA<br>LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS<br>SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD<br>KKVEPKSCDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP<br>KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG<br>KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP<br>ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN<br>VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                               |     |
| C40M126 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYY<br>WGWIRQPPGKGLEWIGNIYYRGDTYYSPSLKSRVT<br>ISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAKGFRFDY<br>WGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA<br>LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS<br>SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD<br>KKVEPKSCDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP<br>KDTLMISRTPEVTCVVDVEHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG<br>KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP<br>ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN<br>VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | 129 |

Tabla 18.

| mAb    | ADN de HC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | ADN de HC de la sec. con núm. de ident.: |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| C40M67 | GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCGGCCT<br>GGTGCAGCCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCT<br>GCGCGGCGAGCGGCTTTACCTTTAGCGACTATG<br>CGATGAACTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAA<br>GGCCTGGAATGGGTGAGCGGGATCAAGAGCGG<br>CGGTAGCTCCAAATATTATGCGGATAGCGTGAAA<br>GGCCGCTTTACCATAGCCGCGATAACAGCAAA<br>AACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGC<br>GCGGAAGATAACGCGGTGTATTATTGCGCGAAA<br>CACGTTGACTTTTATAGGGCCTTGGAATTGGG<br>GCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCC | 140                                      |

|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |     |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|        | <p> TCCACCAAGGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA<br/> CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG<br/> GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC<br/> GAACCGGTGACGGTGTCTGCGTGAAGTCAAGGCGC<br/> CCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGT<br/> CCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG<br/> CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC<br/> CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC<br/> CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCC<br/> CAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCCACCG<br/> TGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGGACCGTCA<br/> GTCTTCCTCTTCCCCCCTAAAACCCAAGGACACCC<br/> TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCG<br/> TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG<br/> GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG<br/> GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG<br/> CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC<br/> CTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC<br/> AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC<br/> CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA<br/> GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC<br/> ACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAG<br/> AACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC<br/> TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG<br/> AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC<br/> ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC<br/> TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC<br/> AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC<br/> GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG<br/> CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA </p> |     |
| C40M66 | <p> CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGT<br/> GAAAAAACCAGGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGCTG<br/> CAAAGCGAGCGGCGGCACCTTTAGCAGCTATGC<br/> GATTAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGG<br/> GCCTGGAATGGATGGGCGGCATTATTCCGATTTT<br/> TGGCACCGCGAACTATGCGCAGAAATTTAGAGG<br/> CCGCGTGACCATTACCGCGGATGAAAGCACCAAG<br/> CACCGCGTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGCAG<br/> CGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGT<br/> TCGGTATTGCGCGTGGTATAGGGACTCTTTGGA<br/> CTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACAGTCTC<br/> GAGTGCCTCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCC<br/> CCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG<br/> CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA<br/> CTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCA </p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 141 |

|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |     |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|        | AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC<br>GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC<br>AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG<br>GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC<br>AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTT<br>GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCC<br>CACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGGAC<br>CGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGA<br>CACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC<br>ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC<br>TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT<br>GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA<br>GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG<br>CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA<br>TGGAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA<br>AGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC<br>CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT<br>GTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGAC<br>CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA<br>AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG<br>GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAA<br>GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC<br>CTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG<br>AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC<br>TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC<br>ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA |     |
| C40M63 | CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGT<br>GAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGCTG<br>CAAAGCGAGCGGCGGCACCTTTAGCAGCTATGC<br>GATTAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGG<br>GCCTGGAATGGATGGGCGGCATTATTCCGATTTT<br>TGGCACCGCGAACTATGCGCAGAAATTTAGGG<br>CCGCGTGACCATTACCGCGGATGAAAGCACCAAG<br>CACCGCGTATATGGAACTGAGCAGCCTGCGCAG<br>CGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGT<br>AGGCCATCCGGCTTGGTGGCGTGATTGTTGGA<br>CTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAG<br>CAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC<br>CCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG<br>CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA<br>CTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTC<br>AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC<br>GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC<br>AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG<br>GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC                                                                                                                                                                                                                                                                            | 142 |

|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |     |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|        | AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTT<br>GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCC<br>CACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGAC<br>CGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGA<br>CACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC<br>ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC<br>TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT<br>GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA<br>GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG<br>CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA<br>TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA<br>AGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC<br>CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT<br>GTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGAC<br>CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA<br>AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG<br>GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA<br>GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC<br>CTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG<br>AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC<br>TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC<br>ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA                                          |     |
| C40M62 | CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGT<br>GAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGCTG<br>CAAAGCGAGCGGCGGCACCTTTAGCAGCTATGC<br>GATTAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGG<br>GCCTGGAATGGATGGGCGGCATTATTCCGATTTT<br>TGGCACCGCGAACTATGCGCAGAAATTT CAGGG<br>CCGCGTGACCATTACCGCGGATGAAAGCACCAG<br>CACCGCGTATATGGAAGT GAGCAGCCTGCGCAG<br>CGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGTT<br>GCCAACGCTGCGTATTTTAGGTCTGGCTTGGA<br>ATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCA<br>GCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCC<br>TGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA<br>CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT<br>TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAG<br>GCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGG<br>CTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG<br>CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG<br>CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAG<br>CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG<br>CCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCAC<br>CGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGT<br>CAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACAC | 143 |

|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |     |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|        | CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC<br>GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG<br>GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG<br>GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG<br>CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCC<br>TCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA<br>GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC<br>CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCA<br>AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC<br>TGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACC<br>AGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA<br>TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA<br>TGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCC<br>TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC<br>TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG<br>CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC<br>ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG<br>CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |     |
| C40M59 | CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGT<br>GAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGCTG<br>CAAAGCGAGCGGCGGCACCTTCAGCTCCTACTG<br>GATTAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGG<br>GCCTGGAATGGATGGGCTACATTATTCCGATCAG<br>TGGCACTGCCCGCTACGCGCAGAAATTTAGGG<br>CCGCGTGACCATTACCGCTGATGAAAGCACCA<br>CACCGCGTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGCAG<br>CGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGAA<br>CCAGGCTACAGTAGTGGCCTGAGCGTTGACTACT<br>TTGATTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAG<br>TCTCGAGTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTT<br>CCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG<br>GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA<br>CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAA<br>CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTT<br>CCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC<br>CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC<br>TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC<br>ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAG<br>TTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATG<br>CCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG<br>ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAG<br>GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA<br>CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC<br>CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT<br>GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA | 144 |

|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |     |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|        | GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG<br>CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT<br>GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA<br>GCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA<br>AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT<br>ACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCA<br>AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG<br>GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG<br>AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGA<br>CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT<br>TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG<br>CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC<br>CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG<br>CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |     |
| C40M58 | GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGGGCC<br>TGGTGCAGCCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAG<br>CTGCGCGGCGAGCGGCTTTACCTTTAGCAGCT<br>ATGCGATGAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGG<br>CAAAGGCCTGGAATGGGTGAGCGCGATCAGCG<br>GCTCCGGTGGCTCCACATATTATGCGGATAGC<br>GTGAAAGGCCGCTTTACCATTTCACGAGATAAC<br>AGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGC<br>CTGCGCGCGGAAGATAACCGCGGTGTATTATTG<br>CGCGCGCGGTCCAGCATACTATCGTTTTTTGA<br>TTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTCT<br>CGAGTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTC<br>CCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG<br>GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG<br>GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTG<br>GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACA<br>CCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT<br>ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCC<br>AGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA<br>CGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG<br>ACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA<br>CTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAA<br>CTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCC<br>CCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG<br>GACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACG<br>TGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT<br>GGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCC<br>AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG<br>CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCC<br>TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC<br>AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGC | 145 |

|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |     |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|        | CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG<br>GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC<br>CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAG<br>GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT<br>CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA<br>TGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGC<br>CTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC<br>CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG<br>GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG<br>TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC<br>AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |     |
| C40M56 | GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCGGCCT<br>GGTGCAGCCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCT<br>GCGCGGCGAGCGGCTTTACCTTTAGCAGCTATG<br>CGATGAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAA<br>GGCCTGGAATGGGTGAGCGCGATCAGCGGCTC<br>CGGTGGCTCCACATATTATGCGGATAGCGTGAA<br>AGGCCGCTTTACCATTTACAGAGATAACAGCAAA<br>AACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGC<br>GCGGAAGATAACGCGGTGTATTATTGCGCGCGC<br>GGTCTGTTTATTCTCTGGTTTTTGACTIONGGG<br>GCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTCTCGAGTGCCT<br>CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC<br>CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG<br>CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCG<br>AACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCC<br>TGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCC<br>TACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT<br>GGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA<br>GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAG<br>CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA<br>ATCTTGTGACAAACTCACACATGCCCACCGTGC<br>CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTC<br>TTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCA<br>TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG<br>TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA<br>AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC<br>ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT<br>ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA<br>CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG<br>AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC<br>CAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA<br>AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC<br>TGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACC<br>AGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT | 146 |

|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |     |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|        | ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA<br>ATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGC<br>CTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC<br>TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT<br>GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA<br>TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA<br>AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |     |
| C40M55 | CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGT<br>GAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGCTG<br>CAAAGCGAGCGGCGGCACCTTCAGCAGCTATGC<br>GATTAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGG<br>GCCTGGAATGGATGGGCGGCATTATTCCGATTTT<br>TGGCACCGCTAACTACGCGCAGAAATTTACGGGC<br>CGCGTGACCATTACCGCTGATGAAAGCACCAAGCA<br>CCGCGTATATGGAACCTGAGCAGCCTGCGCAGCG<br>AAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGATGG<br>TTATCGGCGGTATGGCATCGGTGTTACGGTTTC<br>GATTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACAGTC<br>TCGAGTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC<br>CCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGG<br>GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT<br>ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCT<br>CAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCC<br>CGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCT<br>CAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT<br>GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC<br>AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTT<br>GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCC<br>CACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGAC<br>CGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCTAAACCAAGGA<br>CACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACA<br>TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT<br>GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG<br>GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG<br>GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC<br>GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG<br>GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC<br>CCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA<br>GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC<br>ACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAG<br>AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT<br>TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA<br>GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCA<br>CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT<br>CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG | 147 |

|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|        | GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT<br>GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG<br>AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |     |
| C40M51 | GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCGGCCT<br>GGTGCAGCCGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCT<br>GCGCGGCGAGCGGCTTTACCTTTAGCAGCTATG<br>CGATGAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAA<br>GGCCTGGAATGGGTGAGCGCGATCAGCGGCTC<br>CGGTGGCTCCACATATTATGCGGATAGCGTGAA<br>AGGCCGCTTTACCATTTCACGAGATAACAGCAAA<br>AACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGC<br>GCGGAAGATAACGCGGTGTATTATTGCGCGCGC<br>GGCCAGTTTATTCTAGCGTTTTTCGACTATTGGG<br>GCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTCTCGAGTGCCT<br>CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC<br>CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG<br>CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCG<br>AACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCC<br>TGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCC<br>TACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT<br>GGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA<br>GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAG<br>CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA<br>ATCTTGTGACAAACTCACACATGCCCACCGTGC<br>CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTC<br>TTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCA<br>TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG<br>TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA<br>AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC<br>ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT<br>ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA<br>CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG<br>AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC<br>CAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA<br>AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC<br>TGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACC<br>AGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT<br>ATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA<br>ATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGC<br>CTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC<br>TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT<br>GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA<br>TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA<br>AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA | 148 |

|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |     |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| C40M18 | GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGAGGACT<br>GGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTG<br>TGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGC<br>TATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGCAAGG<br>GACTGGAATGGGTGTCCATCATCAACAACAACGT<br>GGGCCGGACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGG<br>GCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGA<br>ACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGG<br>CCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGCCAAAG<br>AGGGCGGCGATTACTACTACTACGGCATGGACG<br>TGTGGGGCCAGGGCACCAACCGTGACAGTGTCAT<br>CTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCC<br>TGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA<br>CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT<br>TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAG<br>GCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCG<br>GCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCA<br>GCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG<br>GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAA<br>GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGA<br>GCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCA<br>CCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGGACC<br>GTCAGTCTTCTCTTCCCCCCTCAAGGAC<br>ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACA<br>TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT<br>GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG<br>GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG<br>GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC<br>GTCCTACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAAT<br>GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA<br>GCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC<br>AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG<br>TACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACC<br>AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA<br>GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG<br>GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAG<br>ACCACGCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCC<br>TTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA<br>GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCT<br>CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA<br>CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA | 149 |
| C40M17 | GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGAGGACT<br>GGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTG<br>TGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGC<br>TATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGCAGAG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 150 |

|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|        | GACTCGAGTGGGTGTCCACCATCAACAACAGCG<br>GCGGAGGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAG<br>GGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAG<br>AACACCCTGTACCTGCACATGAACAGCCTGCGG<br>GCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGCCAAA<br>GAGGGCGGCAAGTACTACTACTATGCCATGGAC<br>GTGTGGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTC<br>ATCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC<br>CCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG<br>CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA<br>CTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTC<br>AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCC<br>GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC<br>AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG<br>GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC<br>AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTT<br>GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCC<br>CACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGAC<br>CGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGA<br>CACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC<br>ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC<br>TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT<br>GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA<br>GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG<br>CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA<br>TGGAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA<br>AGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC<br>CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT<br>GTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGAC<br>CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA<br>AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG<br>GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC TACAA<br>GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC<br>CTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG<br>AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC<br>TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC<br>ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA |     |
| C40M12 | GAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAGGACTG<br>GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGT<br>GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCGGCAGCTACGCT<br>ATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAGGGA<br>CTGGAATGGGTGTCCGTGATCAGCGACAGCGGC<br>GGCAGAACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGC<br>CGGTTACCATCAGCCGGGACTACAGCAAGAAC<br>ACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGGCC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 151 |

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|       | GAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGCCAAAGAG<br>GGCGGCGATTACTACTACTACGGCATGGACGTGT<br>GGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTCTCTG<br>CCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG<br>CACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG<br>CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC<br>CCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCG<br>CCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTG<br>TCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG<br>CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC<br>CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC<br>AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC<br>AAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGT<br>GCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAG<br>TCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCT<br>CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG<br>GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC<br>AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG<br>CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG<br>TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA<br>CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG<br>AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC<br>AGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA<br>GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG<br>CCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAG<br>GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC<br>CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG<br>GGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTC<br>CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTA<br>CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA<br>GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT<br>GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC<br>CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA |     |
| C40M9 | CAGCTCCAGCTGCAGGAATCTGGCCCTGGCCTG<br>GTCAAGCCCAGCGAGATCCTGAGCCTGACCTGTA<br>CCGTGTCCGGCGGCAGCATCAGCAGCAGCTCTT<br>ACTACTGGGGCTGGATCCGGCAGCCTCCCGGCA<br>AGGGACTGGAATGGATCGGCAACATCTACTACCG<br>GGGCGACACCTACTACAGCCCCAGCCTGAAGTC<br>CAGAGTGACCATCAGCGTGGACACCAGCAAGAA<br>CCAGTTCTCCCTGAAGCTGAACAGCGTGACAGCC<br>GCCGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGC<br>TTCAGATTTCGATTACTGGGGCCAGGGCACCTGG<br>TCACCGTGTCTATCTGCCTCCACCAAGGGCCCATC<br>GGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 152 |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|         | <p> TCTGGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC<br/> AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGT<br/> GGAATCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACA<br/> CCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA<br/> CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAG<br/> CAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG<br/> AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA<br/> AAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACAC<br/> ATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGG<br/> GGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCC AAAACCC<br/> AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG<br/> GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA<br/> GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG<br/> GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC<br/> GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG<br/> TCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT<br/> GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC<br/> AAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCT<br/> CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG<br/> TGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGA<br/> CCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCA<br/> AAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG<br/> GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAA<br/> GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC<br/> CTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG<br/> AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC<br/> TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA<br/> CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA </p> |     |
| C40M102 | <p> GAGGTGCAGCTGGTGGGAATCTGGCGGAGGACTG<br/> GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGT<br/> GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGCT<br/> ATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAGGGA<br/> CTGGAATGGGTGTCCATCATCAACAACAACGTGG<br/> GCCGGACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCA<br/> GATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACAC<br/> CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGA<br/> GGACACCGCCGTGTACTATTGTGCCAAAGAGGG<br/> CGGCGATTACTACTACTACGGCATGGACGTGTGG<br/> GGCCAGGGCACCAACCGTGACAGTGTCTATCTGCC<br/> TCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA<br/> CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG<br/> GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC<br/> GAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCC<br/> CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTC<br/> CTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCG </p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 149 |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |     |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|         | TGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC<br>AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAG<br>CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAA<br>TCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCC<br>CAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCT<br>TCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCAT<br>GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT<br>GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA<br>GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA<br>TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA<br>CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC<br>GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG<br>TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG<br>CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG<br>GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC<br>CCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT<br>CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC<br>AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG<br>CAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCC<br>GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACA<br>GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC<br>AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA<br>GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT<br>CTCCCTGTCTCCGGGTAAA |     |
| C40M103 | GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGAGGACTG<br>GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGT<br>GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGCT<br>ATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAGGGA<br>CTGGAATGGGTGTCCATCATCAACAACAACGTGG<br>GCCGGACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCA<br>GATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACAC<br>CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGA<br>GGACACCGCCGTGTACTATTGTGCCAAAGAGGG<br>CGGCGATTACTACTACTACGGCATGGACGTGTGG<br>GGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTCATCTGCC<br>TCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA<br>CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG<br>GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC<br>GAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCC<br>CTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTC<br>CTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCG<br>TGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC<br>AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAG<br>CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAA<br>TCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCC                                                                                                     | 149 |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |     |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|         | CAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCT<br>TCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCAT<br>GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT<br>GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA<br>GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA<br>TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA<br>CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC<br>GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG<br>TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG<br>CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG<br>GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC<br>CCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT<br>CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC<br>AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG<br>CAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC<br>GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACA<br>GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC<br>AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA<br>GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT<br>CTCCCTGTCTCCGGGTAAA                                                                                                                                                                          |     |
| C40M104 | GAGGTGCAGCTGGTGGAACTCTGGCGGAGGACT<br>GGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTT<br>GTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTAC<br>GCTATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAA<br>GGGACTGGAATGGGTGTCCATCATCAACAACAA<br>CGTGGGCCGGACCTACTACGCCGACAGCGTGA<br>AGGGCAGATTACCATCAGCCGGGACAACAGC<br>AAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTG<br>CGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGC<br>CAAAGAGGGCGGCGATTACTACTACTACGGCA<br>TGGACGTGTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACA<br>GTGTCATCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGT<br>CTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCT<br>CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT<br>CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT<br>CGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG<br>CACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGA<br>CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC<br>CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT<br>GCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG<br>GTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC<br>AAAACTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCT<br>GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTT<br>CCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC<br>CCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGG | 149 |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |     |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|         | ACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC<br>AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA<br>TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA<br>ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC<br>GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA<br>GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC<br>AGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA<br>AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC<br>TGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC<br>CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT<br>CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA<br>GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACC<br>ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT<br>CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG<br>CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCT<br>CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA<br>CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |     |
| C40M105 | CAGCTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCCGGCC<br>TGGTGAAGCCCAGCGAGACCCTGAGCCTGACC<br>TGCACCGTGAGCGGCGGCAGCATCAGCAGCAG<br>CAGCTACTACTGGGGCTGGATCCGGCAGCCCC<br>CCGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAACATC<br>TACTACCGGGGCGACACCTACTACAGCCCCAG<br>CCTGAAGAGCCGGGTGACCATCAGCGTGGACA<br>CCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGC<br>AGCGTGACCGCCGCGGACACCGCCGTGTAATA<br>CTGCGCCCCGGGGCTTCCGGTTCGACTACTGGG<br>GCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCGC<br>CTCCACCAAGGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG<br>CACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA<br>GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT<br>CCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAG<br>GCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCG<br>GCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC<br>AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT<br>GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC<br>ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA<br>GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACA<br>TGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGG<br>GGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACC<br>CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG<br>AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC<br>GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT<br>GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA<br>AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC | 153 |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|         | CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA<br>GGA CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA<br>AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATC<br>GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC<br>CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT<br>CCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGC<br>CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC<br>GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA<br>GCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCCG<br>TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACA<br>GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG<br>CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT<br>GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG<br>CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |     |
| C40M121 | CAGCTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCCGGCC<br>TGGTGAAGCCCAGCGAGACCCTGAGCCTGACC<br>TGCACCGTGAGCGGCGGCAGCATCAGCAGCAG<br>CAGCTACTACTGGGGCTGGATCCGGCAGCCCC<br>CCGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAACATC<br>TACTACCGGGGCGACACCTACTACAGCCCCAG<br>CCTGAAGAGCCGGGTGACCATCAGCGTGGACA<br>CCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGC<br>AGCGTGACCGCCGCGGACACCGCCGTGTACTA<br>CTGCGCCAAGGGCTTCCGGTTCGACTACTGGG<br>GCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCGC<br>CTCCACCAAGGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG<br>CACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA<br>GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT<br>CCCC GAACCGGTGACGGTGTCGTGGA ACTCAG<br>GCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCG<br>GCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC<br>AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT<br>GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC<br>ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA<br>GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA ACTCACACA<br>TGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGG<br>GGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC AAAACC<br>CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG<br>AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC<br>GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT<br>GGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAA<br>AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC<br>CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA<br>GGA CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA<br>AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATC | 154 |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|         | GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC<br>CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT<br>CCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGC<br>CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC<br>GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA<br>GCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCG<br>TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACA<br>GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG<br>CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT<br>GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG<br>CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |     |
| C40M126 | CAGCTGCAGCTGCAGGAGAGCGGGCCCCGGCC<br>TGGTGAAGCCCAGCGAGACCCTGAGCCTGACC<br>TGCACCGTGAGCGGCGGCAGCATCAGCAGCAG<br>CAGCTACTACTGGGGCTGGATCCGGCAGCCCC<br>CCGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCAACATC<br>TACTACCGGGGCGACACCTACTACAGCCCCAG<br>CCTGAAGAGCCGGGTGACCATCAGCGTGGACA<br>CCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGC<br>AGCGTGACCGCCGCCGACACCGCCGTGTACTA<br>CTGCGCCAAGGGCTTCCGGTTCGACTACTGGG<br>GCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCGC<br>CTCCACCAAGGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG<br>CACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA<br>GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT<br>CCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAG<br>GCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCG<br>GCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC<br>AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT<br>GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC<br>ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA<br>GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCACACA<br>TGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGG<br>GGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCCTAAACC<br>CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG<br>AGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGGAGCAC<br>GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT<br>GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA<br>AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC<br>CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA<br>GGAAGTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA<br>AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATC<br>GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC<br>CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT<br>CCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGC | 155 |

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                         |  |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC<br>GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA<br>GCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCG<br>TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACA<br>GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG<br>CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT<br>GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG<br>CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA |  |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

**Tabla 19.**

| mAb    | Aminoácido de LC                                                                                                                                                                                                                                     | Sec. con<br>núm. de<br>ident. LC: |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| C40M67 | EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVKNSSL<br>AWYQQKPGQAPRLIYTASSRATGIPDRFSGSGS<br>GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSSAPPWTFGQG<br>TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL<br>NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS<br>KDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS<br>SPVTKSFNRGEC     | 130                               |
| C40M66 | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSN<br>NKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDR<br>FSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTP<br>LTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA<br>SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV<br>TEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT<br>HQGLSSPVTKSFNRGEC | 131                               |
| C40M63 | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSN<br>NKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDR<br>FSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTP<br>LTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA<br>SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV<br>TEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT<br>HQGLSSPVTKSFNRGEC | 131                               |
| C40M62 | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSN<br>NKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDR<br>FSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTP<br>LTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA<br>SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV<br>TEQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT<br>HQGLSSPVTKSFNRGEC | 131                               |

|        |                                                                                                                                                                                                                                               |     |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| C40M59 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN<br>WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS<br>GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQG<br>TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL<br>NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS<br>KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS<br>SPVTKSFNRGEC | 132 |
| C40M58 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN<br>WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS<br>GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQG<br>TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL<br>NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS<br>KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS<br>SPVTKSFNRGEC | 132 |
| C40M56 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN<br>WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS<br>GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQG<br>TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL<br>NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS<br>KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS<br>SPVTKSFNRGEC | 132 |
| C40M55 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN<br>WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS<br>GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQG<br>TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL<br>NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS<br>KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS<br>SPVTKSFNRGEC | 132 |
| C40M51 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN<br>WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS<br>GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQG<br>TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL<br>NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS<br>KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS<br>SPVTKSFNRGEC | 132 |
| C40M18 | SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVC<br>WYQQKPGQSPVVIYQDSKRPSGIPERFSGSNS<br>GNTATLTISGTQAMDEAYYYCQAWVSSTVVFGG<br>GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV<br>CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQ<br>SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGS<br>TVEKTVAPTECS   | 133 |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                  |     |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| C40M17  | SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYAC<br>WYQQKPGQSPVLVIYQDSRRPSGIPERFSGSNS<br>GNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWASSTVVFGG<br>GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV<br>CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQ<br>SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGS<br>TVEKTVAPTECS     | 134 |
| C40M12  | SYELTQPPSVSVSPGQTASIICSGDKLGDKYVCW<br>YQQKPGQSPVVVIYHDNKRPSGIPERFSGSNSG<br>NTATLTISGTQAMDEADYYCQVWDSSTVVFGGG<br>TKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL<br>ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN<br>NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTV<br>EKTVPAPTECS    | 135 |
| C40M9   | QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYN<br>YVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSKRPSGVPDRFSG<br>SKSGNTASLTVSGLQAEDEADYYCSSYAGSNNL<br>VFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANK<br>ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT<br>PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVT<br>HEGSTVEKTVAPTECS | 136 |
| C40M102 | SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVC<br>WYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNS<br>GNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWVSSTVVFGG<br>GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV<br>CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQ<br>SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGS<br>TVEKTVAPTECS     | 137 |
| C40M103 | SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVS<br>WYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNS<br>GNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWVSSTVVFGG<br>GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV<br>CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQ<br>SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGS<br>TVEKTVAPTECS     | 138 |
| C40M104 | SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVS<br>WYQQKPGQSPVVVIYQDSKRPSGIPERFSGSNS<br>GNTATLTISGTQAMDEAYYYCQAWVSSTVVFGG<br>GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV<br>CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQ<br>SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGS<br>TVEKTVAPTECS     | 139 |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| C40M105 | QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYN<br>YVSWYQQHPGKAPKLMIEVSKRPSGVPDRFSG<br>SKSGNTASLTVSGLQAEDEADYYCSSYAGSNNL<br>VFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANK<br>ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT<br>PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVT<br>HEGSTVEKTVAPTECS | 136 |
| C40M121 | QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYN<br>YVSWYQQHPGKAPKLMIEVSKRPSGVPDRFSG<br>SKSGNTASLTVSGLQAEDEADYYCSSYAGSNNL<br>VFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANK<br>ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT<br>PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVT<br>HEGSTVEKTVAPTECS | 136 |
| C40M126 | QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYN<br>YVSWYQQHPGKAPKLMIEVSKRPSGVPDRFSG<br>SKSGNTASLTVSGLQAEDEADYYCSSYAGSNNL<br>VFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANK<br>ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT<br>PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVT<br>HEGSTVEKTVAPTECS | 136 |

**Tabla 20.**

| mAb    | ADN de LC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | ADN de LC de la sec. con núm. de ident.: |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| C40M67 | GAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCGGGCACCCTG<br>AGCCTGAGCCCGGGCGAACGCGCGACCCTGAG<br>CTGCCGCGCGAGCCAGAGCGTTAAAAATAGCAG<br>TCTGGCGTGGTATCAGCAGAAACCGGGCCAGG<br>CGCCGCGCCTGCTGATTTATACTGCGAGCAGCC<br>GCGCGACCGGCATTCCGGATCGCTTTAGCGGCA<br>GCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCATT<br>GCCGCCTGGAACCGGAAGATTTTGCGGTGTATT<br>ATTGCCAGCAGTCCTCCGCACCTCCGTGGACTT<br>TTGGCCAGGGCACCAAAGTGGAATTAACGTA<br>CGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGC<br>CATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTC<br>TGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGA | 156                                      |

|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|        | GAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCC<br>CTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACA<br>GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC<br>AGCAGCACCTTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC<br>GAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACC<br>CATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC<br>TTCAACAGGGGAGAGTGT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |     |
| C40M66 | GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGACAGCCTG<br>GCCGTGAGCCTGGGCGAGCGGGCCACCATCAAC<br>TGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGCTGTACAGCAGC<br>AACAACAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGA<br>AGCCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTG<br>GGCCAGCACCCGGGAGAGCGGCGTGCCCGACC<br>GGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCA<br>CCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACG<br>TGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTACAGCAC<br>CCCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGA<br>GATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCCCAGCGTGTT<br>CATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGC<br>GGAACCGCAAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACT<br>TCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGG<br>TGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGG<br>AGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCA<br>CCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAA<br>GGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTTGC<br>GAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTG<br>ACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC | 157 |
| C40M63 | GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGACAGCCTG<br>GCCGTGAGCCTGGGCGAGCGGGCCACCATCAAC<br>TGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGCTGTACAGCAGC<br>AACAACAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGA<br>AGCCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTG<br>GGCCAGCACCCGGGAGAGCGGCGTGCCCGACC<br>GGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCA<br>CCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACG<br>TGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTACAGCAC<br>CCCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGA<br>GATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCCCAGCGTGTT<br>CATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGC<br>GGAACCGCAAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACT<br>TCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGG<br>TGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGG<br>AGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCA<br>CCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAA                                                                                                           | 157 |

|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|        | GGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCTTGC<br>GAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTG<br>ACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |     |
| C40M62 | GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGACAGCCTG<br>GCCGTGAGCCTGGGCGAGCGGGCCACCATCAAC<br>TGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGCTGTACAGCAGC<br>AACAAACAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGA<br>AGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTG<br>GGCCAGCACCCGGGAGAGCGGCGTGCCCGACC<br>GGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCA<br>CCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACG<br>TGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTACAGCAC<br>CCCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGA<br>GATCAAGCGGACCGTGCGCCGCCCCCAGCGTGTT<br>CATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGC<br>GGAACCGCAAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACT<br>TCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGG<br>TGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGG<br>AGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCA<br>CCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAA<br>GGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCTTGC<br>GAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTG<br>ACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC | 157 |
| C40M59 | GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG<br>AGCGCCAGCGTGGGCGACCGGGTGACCATCAC<br>CTGCCGGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCT<br>GAACTGGTACCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCC<br>CCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAGCCTGC<br>AGAGCGGCGTGCCCAGCCGGTTCAGCGGCAGC<br>GGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGC<br>AGCCTGCAGCCCCAGGACTTCGCCACCTACTAC<br>TGCCAGCAGAGCTACAGCACCCCCCTGACCTTC<br>GGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGAC<br>CGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCC<br>CAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGAACCGCAA<br>GCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCC<br>GGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC<br>GCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGT<br>GACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA<br>GCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCC<br>GACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCTTGCAG<br>GTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGAC<br>CAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC                   | 158 |

|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |     |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| C40M58 | GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG<br>AGCGCCAGCGTGGGCGACCGGGTGACCATCAC<br>CTGCCGGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCT<br>GAACTGGTACCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCC<br>CCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAGCCTGC<br>AGAGCGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGC<br>GGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGC<br>AGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTAC<br>TGCCAGCAGAGCTACAGCACCCCCCTGACCTTC<br>GGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGAC<br>CGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCC<br>CAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGAACCGCAA<br>GCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCC<br>GGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC<br>GCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGT<br>GACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA<br>GCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCC<br>GACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCTTGCGAG<br>GTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGAC<br>CAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC | 158 |
| C40M56 | GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG<br>AGCGCCAGCGTGGGCGACCGGGTGACCATCAC<br>CTGCCGGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCT<br>GAACTGGTACCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCC<br>CCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAGCCTGC<br>AGAGCGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGC<br>GGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGC<br>AGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTAC<br>TGCCAGCAGAGCTACAGCACCCCCCTGACCTTC<br>GGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGAC<br>CGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCC<br>CAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGAACCGCAA<br>GCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCC<br>GGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC<br>GCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGT<br>GACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA<br>GCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCC<br>GACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCTTGCGAG<br>GTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGAC<br>CAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC | 158 |
| C40M55 | GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG<br>AGCGCCAGCGTGGGCGACCGGGTGACCATCAC<br>CTGCCGGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCT<br>GAACTGGTACCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 158 |

|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|        | CCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAGCCTGC<br>AGAGCGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGC<br>GGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGC<br>AGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTAC<br>TGCCAGCAGAGCTACAGCACCCCCCTGACCTTC<br>GGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGAC<br>CGTGGCCGCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCC<br>CAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGAACCGCAA<br>GCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCC<br>GGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC<br>GCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGT<br>GACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA<br>GCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCC<br>GACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCTTGCGAG<br>GTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGAC<br>CAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC                                                                                                                                                    |     |
| C40M51 | GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGA<br>GCGCCAGCGTGGGCGACCGGGTGACCATCACCT<br>GCCGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGA<br>ACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCA<br>AGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAGCCTGCAGA<br>GCGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGCA<br>GCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCT<br>GCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAG<br>CAGAGCTACAGCACCCCCCTGACCTTCGGCCAG<br>GGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCC<br>GCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACG<br>AGCAGCTGAAGAGCGGAACCGCAAGCGTGGTGT<br>GCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAA<br>GGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAG<br>CGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGA<br>CAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCAC<br>CCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCA<br>CAAGGTGTACGCTTGCGAGGTGACCCACCAGGG<br>CCTGAGCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCG<br>GGGCGAGTGC | 158 |
| C40M18 | TCCTACGAGCTGACCCAGCCTCCCTCCGTGTCT<br>GTGTCTCCTGGCCAGACCGCCAGCATCACCTGT<br>AGCGGCGACAAGCTGGGCGACAAATACGTGTG<br>CTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCG<br>TGGTGGTCATCTACCAGGACAGCAAGAGGCCCA<br>GCGGCATCCCCGAGAGATTAGCGGCAGCAAC<br>AGCGGCAATACCGCCACCCTGACCATCAGCGGC<br>ACCCAGGCCATGGACGAGGCCTACTACTACTGC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 159 |

|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |     |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|        | CAGGCTTGGGTGTCCAGCACCGTGGTGTGTTGGC<br>GGAGGCACCAAGCTGACCGTGCTGGGTCAGCC<br>CAAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCCGCC<br>CTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCAC<br>ACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGG<br>AGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGATAGCA<br>GCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACA<br>CCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCC<br>AGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGG<br>AAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACG<br>CATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGC<br>CCCTACAGAATGTTCA                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |     |
| C40M17 | TCCTACGAGCTGACCCAGCCTCCCTCCGTGTCT<br>GTGTCTCCTGGCCAGACCGCCAGCATCACCTGT<br>AGCGGCGACAAGCTGGGCGATAAGTACGCCTG<br>CTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCG<br>TGCTGGTCATCTACCAGGACAGCAGAAGGCCCA<br>GCGGCATCCCCGAGAGATTCAGCGGCAGCAAC<br>AGCGGCAATACCGCCACCCTGACCATCAGCGGC<br>ACCCAGGCCATGGACGAGGCCGATTACTATTGT<br>CAGGCCTGGGCCAGCAGCACCGTGGTGTGTTGG<br>CGGCGGAACAAAGCTGACCGTGCTGGGTCAGC<br>CCAAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCCGC<br>CCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCA<br>CACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGG<br>GAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGATAGC<br>AGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCAC<br>ACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGC<br>CAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTG<br>GAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCAC<br>GCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGG<br>CCCCTACAGAATGTTCA | 160 |
| C40M12 | TCCTACGAGCTGACCCAGCCTCCCTCCGTGTCT<br>GTGTCTCCTGGCCAGACCGCCAGCATCATCTGC<br>AGCGGCGACAAGCTGGGCGACAAATACGTGTG<br>CTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCG<br>TGGTGGTCATCTACCACGACAACAAGAGGCCCA<br>GCGGCATCCCCGAGAGATTCAGCGGCAGCAAC<br>AGCGGCAATACCGCCACCCTGACCATCAGCGG<br>CACCCAGGCCATGGACGAGGCCGACTACTACT<br>GCCAGGTCTGGGACAGCAGCACCGTGGTGTGTT<br>GGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCTGGGTCA<br>GCCCAAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCC<br>GCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGC                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 161 |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |     |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|         | CACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCC<br>GGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGATA<br>GCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACC<br>ACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCG<br>GCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCA<br>GTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGG<br>TCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACA<br>GTGGCCCCTACAGAATGTTCA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |     |
| C40M9   | CAGTCTGCCCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTG<br>GCTCTCCTGGCCAGAGCGTGACCATCAGCTGTAC<br>CGGCACCAGCTCCGACGTGGGCGGCTACAACTA<br>CGTGTCTGTTATCAGCAGCACCCCGGCAAGGC<br>CCCTAAGCTGATGATCTACGAGGTGTCCAAGCGG<br>CCCAGCGGCGTGCCAGATAGATTGAGCGGCAGC<br>AAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTGACAGTGTCT<br>GGACTGCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACTAC<br>TGTAGCAGCTACGCCGGCAGCAACAACCTGGTGT<br>TCGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCTGGGTC<br>AGCCCAAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCC<br>GCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCC<br>AACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGG<br>GAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGATAGCA<br>GCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACAC<br>CCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAG<br>CAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAG<br>TCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATG<br>AAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTA<br>CAGAATGTTCA | 162 |
| C40M102 | AGCTACGAGCTGACCCAGCCCCCAGCGTGAG<br>CGTGAGCCCCGGCCAGACCGCCAGCATCACCT<br>GCAGCGGCGACAAGCTGGGCGACAAGTACGTG<br>TGCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCC<br>CGTGCTGGTGATCTACCAGGACAGCAAGCGGCC<br>CAGCGGCATCCCCGAGCGGTTGAGCGGCAGCA<br>ACAGCGGCAACACCGCCACCCTGACCATCAGCG<br>GCACCCAGGCCATGGACGAGGCCGACTACTACT<br>GCCAGGCCTGGGTGAGCAGCACCGTGGTGTTC<br>GGCGGCGGCACCAAGCTGACCGTGCTGGGTCA<br>GCCCAAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCC<br>GCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGC<br>CACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCG<br>GGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGATAG<br>CAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCA<br>CACCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGG                                                                                                                                                 | 163 |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|         | CCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGT<br>GGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCA<br>CGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTG<br>GCCCCTACAGAATGTTCA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |     |
| C40M103 | AGCTACGAGCTGACCCAGCCCCCAGCGTGAG<br>CGTGAGCCCCGGCCAGACCGCCAGCATCACCT<br>GCAGCGGCGACAAGCTGGGCGACAAGTACGTG<br>AGCTGGTACCAGCAGAAGCCCCGGCCAGAGCCC<br>CGTGCTGGTGATCTACCAGGACAGCAAGCGGC<br>CCAGCGGCATCCCCGAGCGGTTTCAGCGGCAGC<br>AACAGCGGCAACACCGCCACCCTGACCATCAG<br>CGGCACCCAGGCCATGGACGAGGCCGACTACT<br>ACTGCCAGGCCTGGGTGAGCAGCACCGTGGTG<br>TTCGGCGGGCGGCACCAAGCTGACCGTGCTGGG<br>TCAGCCCAAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTT<br>CCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAA<br>GGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGA CTTCTA<br>CCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCG<br>ATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACC<br>ACCACACCCTCCAAACAAGCAACAACAAGTAC<br>GCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGA<br>GCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCC<br>AGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAG<br>ACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA  | 164 |
| C40M104 | AGCTACGAGCTGACCCAGCCCCCAGCGTGAGC<br>GTGAGCCCCGGCCAGACCGCCAGCATCACCTGC<br>AGCGGCGACAAGCTGGGCGACAAGTACGTGAGC<br>TGGTACCAGCAGAAGCCCCGGCCAGAGCCCCGTG<br>GTGGTGATCTACCAGGACAGCAAGCGGCCCAGC<br>GGCATCCCCGAGCGGTTTCAGCGGCAGCAACAGC<br>GGCAACACCGCCACCCTGACCATCAGCGGCACC<br>CAGGCCATGGACGAGGCCTACTACTACTGCCAG<br>GCCTGGGTGAGCAGCACCGTGGTGTTTCGGCGG<br>CGGCACCAAGCTGACCGTGCTGGGTGAGCCCAA<br>GGCTGCACCCAGTGTC ACTCTGTTCCCGCCCTC<br>CTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACT<br>GGTGTGTCTCATAAGTGA CTTCTACCCGGGAGCC<br>GTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGATAGCAGCCCC<br>GTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACACACCCTCC<br>AAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGC<br>TATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCC<br>CACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAA<br>GGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACA<br>GAATGTTCA | 165 |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |     |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| C40M105 | CAGTCTGCCCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCT<br>GGCTCTCCTGGCCAGAGCGTGACCATCAGCTGT<br>ACCGGCACCAGCTCCGACGTGGGCGGCTACAAC<br>TACGTGTCCTGGTATCAGCAGCACCCCGGCAAG<br>GCCCCTAAGCTGATGATCTACGAGGTGTCCAAGC<br>GGCCCAGCGGCGTGCCAGATAGATTCAGCGGCA<br>GCAAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTGACAGTGT<br>CTGGACTGCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACT<br>ACTGTAGCAGCTACGCCGGCAGCAACAACCTGG<br>TGTTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCTGG<br>GTCAGCCCAAGGCTGCACCCAGTGTCACCTCTGTT<br>CCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAA<br>GGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTAC<br>CCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGA<br>TAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCAC<br>CACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCG<br>GCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAG<br>TGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTC<br>ACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTG<br>GCCCCTACAGAATGTTCA | 162 |
| C40M121 | CAGTCTGCCCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCT<br>GGCTCTCCTGGCCAGAGCGTGACCATCAGCTGT<br>ACCGGCACCAGCTCCGACGTGGGCGGCTACAAC<br>TACGTGTCCTGGTATCAGCAGCACCCCGGCAAG<br>GCCCCTAAGCTGATGATCTACGAGGTGTCCAAGC<br>GGCCCAGCGGCGTGCCAGATAGATTCAGCGGCA<br>GCAAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTGACAGTGT<br>CTGGACTGCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACT<br>ACTGTAGCAGCTACGCCGGCAGCAACAACCTGG<br>TGTTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCTGG<br>GTCAGCCCAAGGCTGCACCCAGTGTCACCTCTGTT<br>CCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAA<br>GGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTAC<br>CCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGA<br>TAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCAC<br>CACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCG<br>GCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAG<br>TGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTC<br>ACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTG<br>GCCCCTACAGAATGTTCA | 162 |
| C40M126 | CAGTCTGCCCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCT<br>GGCTCTCCTGGCCAGAGCGTGACCATCAGCTGT<br>ACCGGCACCAGCTCCGACGTGGGCGGCTACAAC<br>TACGTGTCCTGGTATCAGCAGCACCCCGGCAAG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 162 |

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |  |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | GCCCCTAAGCTGATGATCTACGAGGTGTCCAAGC<br>GGCCCAGCGGCGTGCCAGATAGATTCAGCGGCA<br>GCAAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTGACAGTGT<br>CTGGACTGCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACT<br>ACTGTAGCAGCTACGCCGGCAGCAACAACCTGG<br>TGTTCCGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCTGG<br>GTCAGCCCAAGGCTGCACCCAGTGTCACCTCTGTT<br>CCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAA<br>GGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTAC<br>CCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGA<br>TAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCAC<br>CACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCG<br>GCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAG<br>TGGAAGTCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTC<br>ACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTG<br>GCCCCTACAGAATGTTCA |  |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

Los marcos de anticuerpos se compararon con las secuencias génicas de la línea germinal más próxima para identificar riesgos de inmunogenicidad potenciales. Los mAb C40M18, C40M17, C40M12 y C40M9 de VH y/o VL presentaron mutaciones cuando se compararon con las secuencias de la línea germinal más próximas. La **Tabla 20** muestra los marcos de anticuerpos y el número de mutaciones.

**Tabla 21.**

| mAb    | Marco de cadena pesada más próximo | Número de mutaciones en VH | Marco de cadena ligera más próximo | Número de mutaciones en VL |
|--------|------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| C40M67 | IGHV3-23*03                        | 0                          | IGKV3-20*01                        | NA                         |
| C40M66 | IGHV1-69*01                        | 0                          | IGKV4-1*01                         | 0                          |
| C40M63 | IGHV1-69*01                        | 0                          | IGKV4-1*01                         | 0                          |
| C40M62 | IGHV1-69*01                        | 0                          | IGKV4-1*01                         | 0                          |

|         |             |   |             |   |
|---------|-------------|---|-------------|---|
| C40M59  | IGHV1-69*01 | 0 | IGKV1-39*01 | 0 |
| C40M58  | IGHV3-23*01 | 0 | IGKV1-39*01 | 0 |
| C40M56  | IGHV3-23*01 | 0 | IGKV1-39*01 | 0 |
| C40M55  | IGHV1-69*01 | 0 | IGKV1-39*01 | 0 |
| C40M51  | IGHV3-23*01 | 0 | IGKV1-39*01 | 0 |
| C40M18  | IGHV3-23*04 | 0 | IGLV3-1*01  | 3 |
| C40M17  | IGHV3-23*04 | 2 | IGLV3-1*01  | 0 |
| C40M12  | IGHV3-23*04 | 1 | IGLV3-1*01  | 2 |
| C40M9   | IGHV4-39*01 | 3 | IGLV2-8*01  | 0 |
| C40M102 | IGHV3-23*04 | 0 | IGLV3-1*01  | 1 |
| C40M103 | IGHV3-23*04 | 0 | IGLV3-1*01  | 0 |
| C40M104 | IGHV3-23*04 | 0 | IGLV3-1*01  | 2 |
| C40M105 | IGHV4-39*01 | 0 | IGLV2-8*01  | 0 |
| C40M121 | IGHV4-39*01 | 1 | IGLV2-8*01  | 0 |

### Secuencias marco:

IGHV3-23\*03 (sec. con núm. de ident.: 79)

>IGHV3-23\*03

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV  
SVIYSGGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK

IGHV1-69\*01 (sec. con núm. de ident.: 80)

>IGHV1-69\*01

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM  
GGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR

IGHV3-23\*01 (sec. con núm. de ident.: 81)

>IGHV3-23\*01

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV  
SAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK

IGHV3-23\*04 (sec. con núm. de ident.: 82)

>IGHV3-23\*04

EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV  
SAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK

IGHV4-39\*01 (sec. con núm. de ident.: 73)

>IGHV4-39\*01

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEW  
IGSIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR

IGKV3-20\*01 (sec. con núm. de ident.: 74)

EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY  
GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP

IGKV4-1\*01 (sec. con núm. de ident.: 84)

>IGKV4-1\*01

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPP  
KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTP

IGKV1-39\*01 (sec. con núm. de ident.: 85)

>IGKV1-39\*01

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYA  
ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTP

IGLV3-1\*01 (sec. con núm. de ident.: 86)

IGLV3-1\*01

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPVLVIYQ  
DSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSST

IGLV2-8\*01 (sec. con núm. de ident.: 87)

>IGLV2-8\*01

QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHHPGKAPKLM  
IYEVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEADYYCSSYAGSNF

### **Ejemplo 6. Optimización de anticuerpos agonistas de CD40**

La VH de C40M9 (C40H43; secuencia con núm. de ident.: 60) tenía tres aminoácidos en la región de marco de secuencia diferente a la secuencia de la línea germinal humana más próxima de IGHV4-39 (**sec. con núm. de ident.: 73**). La alineación de los residuos de C40H43 1-98 en comparación con IGHV4-39 se muestra en la **Figura 3**.

IGHV4-39 de la **sec. con núm. de ident.: 73**:

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEW  
IGSIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR

Se prepararon variantes de C40H43 para mutar las posiciones que diferían de las secuencias de la línea germinal de manera individual o en conjunto. Las cadenas de VH resultantes se combinaron con BCML12 de cadena VL parental y los anticuerpos resultantes se probaron en ensayos de unión y funcionales.

La VL de C40M18 (C40L64; secuencia con núm. de ident.: 66) tenía dos aminoácidos en la región de marco de secuencia diferente a la secuencia de la línea germinal humana más próxima de IGLV3-1 (sec. con núm. de ident.: 86). La alineación de la VL de C40M18 en comparación con IGLV3-1 se muestra en la **Figura 4**.

**IGLV3-1 (sec. con núm. de ident.: 86)**

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPVLVIYQ  
DSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSST

Se prepararon variantes de C40L64 para mutar las posiciones que diferían de las secuencias de la línea germinal de manera individual o en conjunto. Además, una cisteína que residía en CDR1 de C40L64 que se mutó. Las variantes de las cadenas de VL resultantes se combinaron con

C40H48 de cadena VH parental y los anticuerpos resultantes se probaron en ensayos de unión y funcionales.

La **Tabla 22** muestra las variantes de anticuerpos generadas. Los anticuerpos C40M103 y C40M104 con cadena de C40L64 con cisteína mutada en LCDR1 tienen la secuencia LCDR1 de SGDKLGDKYVS (**sec. con núm. de ident.: 31**) y otros CDR como en la VH y VL parentales.

Todas las variantes de anticuerpos generados se clonaron como IgG1.

**Tabla 22.**

| mAb                             | VH     | VH con identificación de secuencia núm.: | Número de sustituciones de VH * | VL     | VHL de la sec. con núm. de ident.: | Número de sustituciones de VL * |
|---------------------------------|--------|------------------------------------------|---------------------------------|--------|------------------------------------|---------------------------------|
| C40M102                         | C40H48 | 57                                       | 0                               | C40L70 | 70                                 | 2                               |
| C40M103                         | C40H48 | 57                                       | 0                               | C40L69 | 71                                 | 3                               |
| C40M104                         | C40H48 | 57                                       | 0                               | C40L68 | 72                                 | 1                               |
| C40M105                         | C40H52 | 61                                       | 3                               | BCML12 | 69                                 | 0                               |
| C40M121                         | C40H53 | 62                                       | 2                               | BCML12 | 69                                 | 0                               |
| *En comparación con la parental |        |                                          |                                 |        |                                    |                                 |

Los anticuerpos resultantes se probaron para determinar su unión a CD40 y en ensayos funcionales para evaluar el efecto, de haberlo, de las sustituciones realizadas. La **Tabla 23** muestra los valores de EC<sub>50</sub> para la unión del mAbs a CD40 en células B, célula DC o en células HEK-Blue™ CD40L. Los mAbs C40M102, C40M103 y C40M104 mantuvieron una unión comparable a la del C40M18 parental. C40M105 presentó una unión reducida cuando se comparó con C40M9 parental.

**Tabla 23.**

| Anticuerpo                                             | EC50 (µg/ml)       |                      |               |
|--------------------------------------------------------|--------------------|----------------------|---------------|
|                                                        | HEK-Blue™<br>CD40L | Células B<br>humanas | DC<br>humanas |
| C40M102                                                | 0,1621             | 0,15930              | 0,4379        |
| C40M103                                                | 0,1122             | 0,07502              | 0,1430        |
| C40M104                                                | 0,1775             | 0,10960              | 0,2526        |
| C40M105                                                | 2,1610             | 6,64800              | 5,7650        |
| C40M9                                                  | 0,1433             | 0,06091              | 0,1522        |
| C40M18                                                 | 0,1499             | 0,11000              | 0,2674        |
| C40M9*                                                 | 0,6146             | 0,01910              | 0,04620       |
| C49M121*                                               | 0,464              | 0,02283              | 0,05720       |
| *Los resultados corresponden a un experimento separado |                    |                      |               |

Los anticuerpos se probaron para determinar su actividad agonista en células HEK-Blue™ CD40L y en células B primarias. La **Tabla 24** muestra los valores de EC<sub>50</sub> para los anticuerpos en los ensayos. C40M102, C40M103 y C40M104 presentaron una potencia similar en la activación de células B cuando se compararon con el mAb de C40M18 parental. C40M105 presentó una actividad reducida cuando se comparó con C40M9 parental.

**Tabla 24.**

| Anticuerpo | Ensayo (EC <sub>50</sub> ) (µg/ml) |                       |                             |
|------------|------------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
|            | HEK-Blue™<br>CD40L                 | DC humana<br>(HLA-DR) | Células B humanas<br>(CD83) |
| C40M102    | 0,07515                            | 0,3667                | 0,02388                     |

|                                                     |          |         |           |
|-----------------------------------------------------|----------|---------|-----------|
| C40M103                                             | 0,002742 | 0,3875  | 0,004790  |
| C40M104                                             | 0,03078  | 0,1655  | 0,01671   |
| C40M105                                             | 0,01733  | 2,972   | 0,002819  |
| C40M9                                               | 0,01376  | 0,1178  | 0,0007661 |
| C40M18                                              | 0,06962  | 0,1662  | 0,02262   |
| C40M9*                                              | 0,006210 | 0,01671 | 0,0001452 |
| C40M121*                                            | 0,006332 | 0,01852 | 0,0003343 |
| *El resultado corresponde a un experimento separado |          |         |           |

### **Ejemplo 7. Anticuerpos anti-CD40 agonistas se unen con alta afinidad a CD40 humana**

Las mediciones de afinidad se realizaron mediante el uso de resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés) con un sistema ProteOn XPR36 (BioRad). Se preparó una superficie biosensora mediante el acoplamiento de Fc de IgG antihumano (Jackson cat. num109-005-098) a la superficie de la capa de polímero de alginato modificado de un chip GLC (BioRad, cat. num176-5011) mediante el uso de las instrucciones del fabricante para la química de acoplamiento de aminas. Se inmovilizaron aproximadamente 5000 RU (unidades de respuesta) de mAbs. Los experimentos cinéticos se realizaron a 25 °C en amortiguador fresco (DPBS+0,01 % de P20+100 µg/ml de BSA). Para realizar los experimentos cinéticos, se capturaron 200 RU de mAbs seguido de inyecciones de analitos (CD40 humana o de cyno) a 5 concentraciones (en una dilución seriada en incrementos de 4). La fase de asociación se chequeó durante 3 minutos a 50 µl/min seguido, después, por 15 minutos de flujo de amortiguador de pH

(fase de disociación). La superficie del chip se regeneró por dos pulsos de 18 segundos de 100 mM de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Sigma, cat. núm. 7961) a 100  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

Los datos obtenidos se procesaron mediante el uso del software ProteOn Manager. En primer lugar, se realizó la corrección de los datos con el fondo mediante el uso de puntos intermedios. Después, se realizó la sustracción de doble referencia de los datos mediante el uso de la inyección de regulador de pH para las inyecciones de analitos. El análisis cinético de los datos se realizó mediante el uso de un modelo de unión de Langmuir 1:1. El resultado para cada mAb se reportó en el formato de  $K_a$  (constante de asociación),  $K_d$  (constante de disociación) y  $K_D$  (constante de disociación en equilibrio).

El resumen de la afinidad de cinética para mAbs de CD40 seleccionados para la unión a CD40 humana se muestra en la **Tabla 25**. Los parámetros indicados en esta tabla se obtuvieron a partir de un modelo de unión de Langmuir 1:1 para todas las muestras. Afinidad,  $K_D = k_d/k_a$ .

**Tabla 25.**

| Anticuerpo   | $k_a$ (1/Ms)        | $k_d$ (1/s)         | $K_D$ (M)           |
|--------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| C40M9 (n=5)  | 7,27(1,83)E+05      | 2,85(0,97)E-03      | 4,09(1,51)E-09      |
| C40M12       | 1,30E+06            | 1,76E-04            | 1,36E-10            |
| C40M17       | 2,74E+06            | 8,06E-05            | 2,94E-11            |
| C40M18       | 1,07E+06            | 1,62E-04            | 1,51E-10            |
| C40M51       | 7,40E+05            | 8,78E-04            | 1,19E-09            |
| C40M55 (n=2) | 9,44(8,68-10,2)E+05 | 2,03(1,88-2,17)E-03 | 2,15(2,12-2,17)E-09 |
| C40M56       | 7,77E+05            | 1,01E-03            | 1,30E-09            |

|        |          |          |          |
|--------|----------|----------|----------|
| C40M58 | 4,17E+05 | 7,14E-04 | 1,71E-09 |
| C40M59 | 1,18E+05 | 1,06E-03 | 9,00E-09 |
| C40M62 | 1,89E+05 | 2,47E-03 | 1,31E-08 |
| C40M63 | 5,28E+05 | 6,41E-04 | 1,21E-09 |
| C40M66 | 3,78E+05 | 1,16E-03 | 3,05E-09 |
| C40M67 | 1,63E+05 | 3,10E-04 | 1,91E-09 |

C40M9 n=5 réplicas, valores listados como promedio y (desviación estándar)

C40M55 n=2 réplicas, valores listados como promedio y (rango)

2 muestras (C40M9, C40M55) no se ajustaron adecuadamente al modelo de unión 1:1.

El resumen de la afinidad de cinética para mAbs de CD40

seleccionados que se unen a **CD40 de Cyno se muestra en la Tabla 26.**

Los parámetros indicados en esta tabla se obtuvieron a partir de un modelo de unión de Langmuir 1:1 para todas las muestras. Afinidad,  $K_D = k_d/k_a$ .

**Tabla 26.**

| <b>Anticuerpo</b> | <b><math>k_a</math> (1/Ms)</b> | <b><math>k_d</math> (1/s)</b> | <b><math>K_D</math> (M)</b> |
|-------------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| C40M9 (n=3)       | 9,01(1,02)E+05                 | 1,26(0,07)E-03                | 1,42(0,24)E-09              |
| C40M12            | 1,81E+06                       | 4,41E-04                      | 2,43E-10                    |
| C40M17            | 4,27E+06                       | 1,57E-04                      | 3,68E-11                    |
| C40M18            | 1,32E+06                       | 9,41E-05                      | 7,12E-11                    |
| C40M51            | 4,19E+05                       | 9,49E-04                      | 2,27E-09                    |
| C40M55            | 8,31E+05                       | 2,15E-03                      | 2,59E-09                    |
| C40M56            | 8,06E+05                       | 6,47E-04                      | 8,03E-10                    |
| C40M58            | 4,53E+05                       | 7,23E-04                      | 1,60E-09                    |
| C40M59            | 1,44E+05                       | 9,95E-04                      | 6,92E-09                    |

|        |          |          |          |
|--------|----------|----------|----------|
| C40M62 | 3,43E+05 | 9,08E-04 | 2,64E-09 |
| C40M63 | 7,46E+05 | 3,07E-04 | 4,12E-10 |
| C40M66 | 3,52E+05 | 5,77E-04 | 1,64E-09 |
| C40M67 | 1,84E+05 | 3,41E-04 | 1,85E-09 |

C40M9 n=3 réplicas, valores listados como promedio y (desviación estándar)

4 muestras (C40M55, C40M56, C40M62, C40M63) no se ajustaron adecuadamente al modelo de unión 1:1.

### **Ejemplo 8. Modificación mediante ingeniería genética de Fc de anticuerpos anti-CD40 agonistas**

Se introdujo una mutación de S267E en C40M121 para generare mAb C40M126. C40M126 demostró un agonismo mejorado independiente de la reticulación según se evaluó por medio de expresión de superficie de HLA-DR inducida en células dendríticas (Figura 6).

### **Ejemplo 9. Estructura cristalina de C40M126 en complejo con CD40 humana**

#### **Métodos**

El dominio extracelular (ECD) marcado con His de CD40 humana se expresó en células de insecto Hi5 infectadas con baculovirus y se purificó por afinidad y cromatografía de exclusión por tamaño en Genscript (Piscataway, NJ). El fragmento de Fab marcado con His de mAb C40M126 se expresó en células HEK293 Expi y se purificó por afinidad y cromatografía de exclusión por tamaño. El complejo anticuerpo-antígeno se preparó mediante el

mezclado de los componentes en una relación molar de 1:1,2 con el exceso de Fab y se incubó durante la noche a 4 °C. La proteína se concentró hasta 12 mg/ml en HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM y se cristalizó por el método de difusión por vapor a partir de la solución que contenía sulfato amónico 1,6 M, PEG 400 al 5 %, HEPES 0,1 M, pH 7,5. Un cristal se transfirió al licor madre suplementado con glicerol al 24 %, se congeló en nitrógeno líquido y se usó para la recolección de datos de difracción con rayos X. La estructura se determinó a una resolución de 3,0 Å.

## Resultados

C40M126 se une a CD40 en el sitio distal a la superficie celular (**Figura 5**). El epítipo es conformacional e incluye un tramo continuo de los residuos de aminoácidos 46-64 que forma una horquilla beta y dos residuos más, 75-76, del lazo vecino (numeración de residuos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 75). Los residuos de anticuerpos implicados en la unión de CD40 incluyen 9 residuos de la cadena ligera y 11 residuos de la cadena pesada (**Figura 6**). Los seis CDR participan en la unión. La interfase anticuerpo-antígeno se extiende y cubre más de 900 Å<sup>2</sup> en cada molécula.

C40M126 es una variante de C40M9 que tiene dos mutaciones en la región de marco de la cadena pesada, I17T y N85S, cuando se compara con C40M9. Estos dos residuos se encuentran lejos del sitio de unión del mAb y no afectan las características de unión del anticuerpo. Por lo tanto, se espera que C40M9 se una a los mismos residuos del epítipo que C40M126.

Por lo tanto, todas las conclusiones relacionadas con el epítopo y el mecanismo de acción se mantienen para C40B8.

CD40 de cyno es 95 % idéntica a la CD40 humana en el ECD y difiere de la CD40 humana en una sola posición dentro del epítopo. La CD40 del tití tiene más diferencias de aminoácidos respecto de CD40 humana, 4 de las cuales se encuentran dentro del epítopo. Todas las diferencias están en la periferia del epítopo y es probable que sean toleradas por el anticuerpo, es decir, se espera que C40M9 tenga reactividad cruzada hacia CD40 de cyno y también de tití.

La superposición de la estructura anticuerpo-antígeno en el complejo receptor-ligando disponible del banco de datos de proteínas (referencia 3QD6) muestra que los epítomos de C40M126 y CD40L no se superponen. Sin embargo, C40M126 y CD40L competirían por la misma molécula de CD40 debido al efecto estérico, por ejemplo, C40M126 bloquearía la interacción CD40L-CD40.

### **Ejemplo 10. Estudio farmacocinético de anticuerpos anti-CD40 en monos cynomolgus**

#### **Materiales y métodos**

Se administró a monos Cynomolgus Naïve que estuvieron en ayunas durante toda la noche (o al menos 8 horas) una inyección intravenosa de un bolo de anticuerpos anti-CD40 C40M9, C40M126 o un anticuerpo de control

CP-870,893 a 0,1 mg/kg, 10 mg/kg o 10 mg/kg. El bienestar de los animales para el estudio se ajustó a lo indicado en la Ley de Bienestar Animal del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) (9 Código de Regulaciones Federales (CFR), Partes 1, 2 y 3).

Para estudios bioanalíticos, se recolectó aproximadamente 1 ml/muestra de arteria femoral expuesta a dosis de radiación (ore-dose) y a 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 horas y a los días 7, 14, 21 y 28 después de la dosis. Las muestras se dejaron coagular a temperatura ambiente durante al menos 15 minutos y, después, las muestras se centrifugaron en condiciones ambiente dentro de los 30 minutos después de completar la recolección de muestras en cada intervalo. El suero resultante se dividió en tres alícuotas aproximadamente iguales, cuando estaban disponibles, y se colocaron en placas de 96 pocillos. Las muestras se almacenaron congeladas a -60 a -90 °C.

### *Resultados*

Se administró a monos cynomolgus macho un solo bolo intravenoso de C40M9, C40M126 o un anticuerpo control de CP 870,893 a una dosis de 0,1, 1,0 o 10 mg/kg. En general, los efectos tendieron a producirse o fueron más pronunciados con la administración de CP 870,893. Se observaron los siguientes hallazgos:

- Disminuciones moderadas en la masa de glóbulos rojos a 10 mg/kg de C40M9 y 1,0 y 10 mg/kg de CP-870,893 con evidencia de una respuesta

regenerativa adecuada, como se indica por los incrementos en los recuentos de reticulocitos, la amplitud de distribución de glóbulos rojos (RDW), la policromasia y/o los glóbulos rojos nucleados en la revisión microscópica de manchas de sangre; las disminuciones en la masa de glóbulos tendieron a solucionarse en los días 21 y/o 28 mientras que la respuesta regenerativa generalmente persistió.

- Disminuciones transitorias, leves a moderadas en los recuentos plaquetarios a 0,1, 1,0 y 10 mg/kg de CP-870,893.
- Disminuciones transitorias, moderadas de la albúmina, aumentos moderados de la globulina y/o un cambio citoplásmico de neutrófilos a 10 mg/kg de CP-870,893 que fueron sugerentes de un estímulo inflamatorio menor.
- Disminuciones leves en el fibrinógeno a 10 mg/kg de CP-870,893 en los días 14 a 28.
- Evidencia de coagulación transitoria alterada a 10 mg/kg de CP-870,893 indicada por prolongaciones mínimas en el tiempo APTT y de protrombina, que no eran probablemente biológicamente significativas debido a la pequeña magnitud del cambio.

## **Hematología**

Las recolecciones realizadas 72 horas después de la dosis, en el día 7 y/o en el día 14 en machos a 10 mg/kg de C40M9 y 1,0 y 10 mg/kg de CP-870,893 mostraron disminuciones moderadas en la masa de

glóbulos rojos (hasta -29 %; porcentaje de cambio expresado como media del grupo en relación con la media antes de la prueba) de mayor magnitud que las disminuciones en la masa de glóbulos rojos (hasta -20 %) en los otros grupos de tratamiento. Las disminuciones en la masa de glóbulos rojos en los otros grupos de tratamiento fueron generalmente de magnitud similar entre grupos; se consideró que más probablemente se relacionaron ampliamente con el procedimiento y debido a la recolección de sangre farmacocinética repetida, aunque no se pudo hacer una comparación definitiva debido a la falta de controles para la comparación. Las disminuciones mayores en la masa de glóbulos rojos a 10 mg/kg de C40M9 y 1,0 y 10 mg/kg de CP 870,893 se relacionaron más probablemente con los artículos de prueba con contribuciones simultáneas relacionadas con el procedimiento. Las disminuciones en la masa de glóbulos tendieron a solucionarse en los días 21 y/o 28.

En las recolecciones del día 7 al día 28, en todos los grupos se observaron incrementos leves a marcador en los recuentos de reticulocitos (hasta +883 %) con relación a los valores anteriores a la prueba, que fueron indicativos de una respuesta regenerativa adecuada a las disminuciones en la masa de glóbulos rojos. También hubo aumentos concomitantes en la amplitud de la distribución de glóbulos rojos (RDW; hasta +44 %, indicativo de una variación incrementada en el tamaño de los eritrocitos) e incrementos en la policromasia y/o glóbulos rojos nucleados en la revisión microscópica de manchas de sangre a 1,0 y 10 mg/kg de CP-870,893 que

también fueron indicativos de una respuesta regenerativa. La respuesta regenerativa fue más pronunciada a 10 mg/kg de CP-870,893, coincidiendo con la mayor disminución observada en la masa de glóbulos rojos.

En las recolecciones realizadas 72 horas después de la dosis a  $\geq 0,1$  mg/kg de CP-870,893 y en el día 7 y día 14 a 10 mg/kg de CP-870,893, se observaron disminuciones transitorias leves a moderadas en los recuentos plaquetarios (hasta -81 %) respecto de los valores antes de la prueba que se consideraron como relacionados con CP-870,893. Estas disminuciones fueron seguidas de incrementos transitorios en los recuentos plaquetarios en recolecciones posteriores que fueron indicativos de una respuesta regenerativa adecuada, y generalmente se resolvieron en las recolecciones del día 28. La Figura 8 muestra los recuentos plaquetarios en el tiempo en animales a los que se dosificó 10 mg/kg de C40M9, C40M126 o el anticuerpo de control CP-870,893. La disminución transitoria en los recuentos plaquetarios no se observó en animales a los que se dosificó C40M9 o C40M126.

En las recolecciones del día 14 en un macho a 10 mg/kg de CP 870,893, se observó un cambio citoplásmico de neutrófilos en la revisión microscópica de las manchas de sangre. Este cambio fue más indicativo de un estímulo inflamatorio, como se relaciona con las disminuciones en la albúmina y los incrementos en la globulina.

En las recolecciones realizadas 72 horas después de la dosis y/o en el Día 7 en machos a  $\geq 0,1$  mg/kg de CP-870,893 y al 10 mg/kg de

C40M126 se observaron disminuciones leves a moderadas en los recuentos de linfocitos (hasta -46 %) respecto de los valores previos a la prueba, que generalmente se resolvieron en recolecciones posteriores. La relación entre estos cambios y los artículos de prueba fue incierta debido a su magnitud generalmente similar entre grupos de tratamiento y la relación de los valores medios e individuales con los valores esperados para la variación biológica y relacionada con el procedimiento.

Todas las demás fluctuaciones en los criterios de valoración hematológica se consideraron no significativas debido a su pequeña magnitud, naturaleza esporádica, proximidad a la dosificación y/o relación con los valores esperados para la variación biológica y relacionada con el procedimiento.

### **Coagulación**

En las recolecciones de los días 7 y 14 en machos a 10 mg/kg de CP 870,893, se observaron prolongaciones mínimas en APTT (hasta +32 %) y tiempo de protrombina (hasta +22 %) respecto de los valores anteriores a la prueba. Estos cambios estuvieron relacionados con CP-870,893 y eran indicativos de coagulación alterada, aunque probablemente no significativos biológicamente debido a la pequeña magnitud de estos cambios. Se resolvieron en recolecciones posteriores.

En las recolecciones de los días 14, 21, y 28 en machos a 10 mg/kg de CP-870,893, se observaron disminuciones leves en el fibrinógeno (hasta -66 %) respecto de los valores previos a la prueba. Estos cambios

estuvieron relacionados con CP-870,893 y pueden estar relacionados con la coagulación alterada. Otras fluctuaciones en los tiempos de coagulación (es decir, APTT y tiempo de protrombina) y fibrinógeno se consideraron no significativas debido a su pequeña magnitud, dirección del cambio y/o relación con los valores esperados.

### **Química clínica**

En las recolecciones de los días 7, 14, y 21 en machos a 10 mg/kg de CP-870,893, se observaron disminuciones moderadas en la albúmina (hasta -30 %) e incrementos en la globulina (hasta +33 %) respecto de los valores previos a la prueba. Estos cambios se consideran relacionados con el artículo de prueba y sugieren un estímulo inflamatorio menor, como se relaciona con el cambio citoplásmico de neutrófilos observado en uno de dos animales (ver sección de hematología). Estos cambios tendieron a resolverse en las recolecciones del día 28. Las disminuciones mínimas a leves en la albúmina (hasta -16 %) se observaron generalmente en otros grupos de tratamiento en todas las recolecciones, aunque estas disminuciones tendieron típicamente a regresar a los valores anteriores a la prueba en las recolecciones del día 21 y/o día 28. Estas disminuciones se consideraron más probablemente relacionadas con el procedimiento, como se relacionan con las disminuciones en la masa de glóbulos rojos (ver sección de hematología). Las disminuciones en la albúmina generalmente presentaron disminuciones concomitantes en calcio debido a que la albúmina es el principal transportador de calcio en la sangre, así como disminuciones concomitantes en la proteína total y/o las

relaciones de albúmina a globulina. Estos cambios carecían de hallazgos correlativos entre otros criterios de valoración del estudio.

En las recolecciones a las 72 horas después de la dosis y/o en el día 7 en machos en todos los grupos de tratamiento excepto al 1,0 mg/kg de C40M126, se observaron incrementos leves a moderados en aspartato aminotransferasa (AST; hasta +529 %) y/o alanina aminotransferasa (ALT; hasta +374 %) respecto de los valores anteriores a la prueba que generalmente se resolvieron en colecciones posteriores y sugirieron mayormente lesión muscular menor. Estos cambios se consideraron más probablemente relacionados con el procedimiento, posiblemente asociados con la venopunción repetida, debido a la falta de un patrón sensible a la dosis, la naturaleza transitoria y la falta de hallazgos correlativos entre otros criterios de valoración del estudio.

Todas las demás fluctuaciones en los criterios de valoración de química clínica se consideraron no significativas debido a su pequeña magnitud, naturaleza esporádica, proximidad a la dosificación y/o relación con los valores esperados.

Los datos de toxicidad generados en este estudio de tolerabilidad de cyno sugieren que C40M9 y C40M126 inducen una menor reducción de plaquetas y niveles más bajos de tormenta de citocinas cuando se comparan con el anticuerpo de control, presumiblemente a partir de la activación de APC impulsada por la actividad agonista del anticuerpo de CD40. En conjunto, C40M9 y C40M126 pueden inducir menos toxicidad

relacionada con la actividad de CD40 mientras mantienen la activación de APC robusta como se muestra en la activación de DC in vitro.