

ANTICUERPOS ANTI-CD30L Y USOS DE LOS MISMOS**REFERENCIA A LA SOLICITUD RELACIONADA**

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad a la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 63/537,933, presentada 12 de septiembre de 2023, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

Se incorpora por referencia en su totalidad un listado de secuencias presentado simultáneamente con el presente e identificado de la siguiente manera: Archivo XML de 48.423 kilobytes denominado 10471-WO01-SEC_Sequence_Listing_USPTO_8-26-2024, creado el 26 de agosto de 2024.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de los trastornos inflamatorios. La presente invención se refiere a anticuerpos anti-CD30L y al tratamiento de pacientes con dichos anticuerpos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El ligando del clúster de diferenciación 30 (CD30L, también conocido como TNFL8, o miembro de la superfamilia 8 del ligando del factor de necrosis tumoral) es un miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) y está codificado por el gen TNFSF8. La isoforma principal de CD30L comprende una proteína transmembrana de 234 aminoácidos, con 172 aminoácidos en el dominio extracelular. De acuerdo con una de las características distintivas de la superfamilia TNF, CD30L se ensambla en complejos homotriméricos y se une a su receptor CD30 (TNFRSF8). Al unirse a CD30, CD30L estimula la activación de múltiples vías, incluyendo las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la señalización del factor nuclear kappa B (NF-κB). Al igual que otros miembros de la superfamilia del TNF, CD30L y CD30 pueden desprenderse de la membrana celular al ser escindidos por proteasas tal como la enzima convertidora del TNFα (TACE). Se ha demostrado que el acoplamiento CD30L-CD30 estimula un mayor desprendimiento tanto del ligando como del receptor. CD30L soluble (sCD30L) puede unirse a CD30 y estimular su señalización.

La expresión de CD30L está restringida al sistema inmunitario. Su expresión está estrechamente regulada y se observa principalmente en linfocitos y monocitos activados. Los modelos de ratón genéticos y farmacológicos han revelado el papel de la señalización CD30L-CD30 en la regulación de la diferenciación y las funciones efectoras de las células T y las células B auxiliares. Se ha demostrado que la señalización de CD30L regula las citoquinas efectoras de células T auxiliares de amplio espectro, incluyendo Th1, Th2 y Th17. También se ha demostrado que CD30L regula la producción de células B de anticuerpos en múltiples clases de isotipos. Así pues, la señalización CD30L-CD30 regula ampliamente las respuestas inmunitarias adaptativas tanto de tipo 1 como de tipo 2/alérgicas.

Varias líneas de evidencia implican la señalización CD30L-CD30 en múltiples indicaciones de enfermedades inflamatorias. Una rara variante genética de pérdida de función en TNFRSF8 (CD30) está asociada con la protección frente al asma grave (Olafsdottir et al., Nature Communications, 2020). Se han reportado niveles de sCD30 y sCD30L elevados en plasma o suero en varias indicaciones de enfermedad, incluyendo el asma, la enfermedad inflamatoria intestinal y la esclerosis múltiple, lo que sugiere niveles más altos de actividad de señalización de la vía asociados con estas enfermedades. Se ha demostrado que la alteración de la señalización CD30-CD30L en ratones, ya sea mediante modelos genéticos o farmacológicos, disminuye la gravedad de la enfermedad en modelos murinos de enfermedad inflamatoria (véase por ejemplo Kennedy *et al.*, Immunology. 2006 Jun;118(2):143-52). Los anticuerpos anti-CD30L son conocidos (véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 2013/163377 y la publicación PCT n.º WO 20221/77963), sin embargo, el antagonismo terapéutico alternativo de la señalización CD30-CD30L, mediante por ejemplo, anticuerpos anti-CD30L con mayor afinidad y/o potencia, podría proporcionar un amplio beneficio clínico en pacientes humanos.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente divulgación proporciona, en parte, un anticuerpo que se une a CD30L que comprende un HCDR1 que comprende SEQ ID NO: 1, un HCDR2 que comprende SEQ ID NO: 2, un HCDR3 que comprende SEQ ID NO: 3, un LCDR1 que comprende SEQ ID NO: 4, un LCDR2 que comprende SEQ ID NO: 5 y un LCDR3 que comprende SEQ ID NO: 6. En una realización, el anticuerpo comprende: el HCDR1 que consiste en SEQ ID NO: 1, el HCDR2 que consiste en SEQ ID NO: 2, el HCDR3 que consiste en SEQ ID NO: 3, el LCDR1 que consiste en SEQ ID NO: 4, el LCDR2 que consiste en SEQ ID NO: 5 y el LCDR3 que consiste en SEQ ID NO: 6.

En una realización de cualquiera de los anteriores, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende SEQ ID NO: 19, o una variante de la misma que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 19 y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende SEQ ID NO: 20, o una variante de la misma que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 20. En una realización, la variante de SEQ ID NO: 19 comprende no más de 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos relevantes para SEQ ID NO: 19 y la variante de SEQ ID NO: 20 comprende no más de 6, 5, 4, 3, 2, o 1 sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos relevantes para SEQ ID NO: 20, en donde las variaciones ocurren en la región marco de la HCVR, LCVR o tanto HCVR como LCVR. En una realización, el anticuerpo comprende una HCVR que comprende SEQ ID NO:19

y una LCVR que comprende SEQ ID NO: 20. En una realización, el anticuerpo comprende una HCVR que consiste en SEQ ID NO:19 y una LCVR que consiste en SEQ ID NO: 20.

En una realización de cualquiera de las anteriores, el anticuerpo comprende una cadena pesada (HC) que comprende SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera (LC) que comprende SEQ ID NO: 26. En una realización, el anticuerpo comprende dos HC y dos LC, en las que cada HC comprende SEQ ID NO: 25 y cada LC comprende SEQ ID NO: 26. En una realización, el anticuerpo comprende dos HC y dos LC en donde cada HC consiste en SEQ ID NO:25 y cada LC consiste en SEQ ID NO:26. En otra realización, el anticuerpo consiste en dos HC y dos LC en donde cada HC consiste en SEQ ID NO:25 y cada LC consiste en SEQ ID NO:26.

La presente divulgación proporciona un anticuerpo que se une a CD30L que comprende un HCDR1 que comprende SEQ ID NO: 7, un HCDR2 que comprende SEQ ID NO: 8, un HCDR3 que comprende SEQ ID NO: 9, un LCDR1 que comprende SEQ ID NO: 10, un LCDR2 que comprende SEQ ID NO: 11 y un LCDR3 que comprende SEQ ID NO: 12. En una realización de cualquiera de los anteriores, el anticuerpo comprende e HCDR1 que consiste en SEQ ID NO: 7, e HCDR2 que consiste en SEQ ID NO: 8, e HCDR3 que consiste en SEQ ID NO: 9, el LCDR1 que consiste en SEQ ID NO: 10, el LCDR2 que consiste en SEQ ID NO: 11 y el LCDR3 que consiste en SEQ ID NO: 12.

En una realización de cualquiera de las anteriores, el anticuerpo comprende una HCVR que comprende SEQ ID NO: 23, o una variante de la misma que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 23 y una LCVR que comprende SEQ ID NO: 24, o una variante de la misma que comprenda una secuencia de aminoácidos con al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 24. En una realización, la variante de SEQ ID NO: 23 comprende no más de 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos relevantes para SEQ ID NO: 23 y la variante de SEQ ID NO: 24 comprende no más de 6, 5, 4, 3, 2, o 1 sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos relevantes para SEQ ID NO: 24, en donde las variaciones ocurren en la región marco de la HCVR, LCVR o tanto HCVR como LCVR. En una realización, el anticuerpo comprende una HCVR que comprende SEQ ID NO:23 y una LCVR que comprende SEQ ID NO: 24 En una realización, el anticuerpo comprende una HCVR que consiste en SEQ ID NO:23 y una LCVR que consiste en SEQ ID NO: 24.

En una realización de cualquiera de las anteriores, la HC comprende SEQ ID NO: 29, y la LC comprende SEQ ID NO: 30. En una realización, el anticuerpo comprende dos HC y dos LC, en las que cada HC comprende SEQ ID NO: 29 y cada LC comprende SEQ ID NO: 30. En una realización, el anticuerpo comprende dos HC y dos LC en donde cada HC consiste en SEQ ID NO:29 y cada LC consiste en SEQ ID NO: 30. En una realización, el anticuerpo consiste en

dos HC y dos LC en donde cada HC consiste en SEQ ID NO:29 y cada LC consiste en SEQ ID NO: 30.

En el presente documento se proporciona un anticuerpo anti-CD30L que comprende una HC que comprende SEQ ID NO: 29 y una LC que comprende SEQ ID NO: 30. También se proporciona un anticuerpo anti-CD30L que comprende dos HC y dos LC, cada HC comprende SEQ ID NO: 29 y cada LC comprende SEQ ID NO:30. Se proporciona además un anticuerpo anti-CD30L que consiste en dos HC y dos LC, cada HC consiste en SEQ ID NO: 29 y cada LC consiste en SEQ ID NO:30.

También se proporciona un anticuerpo anti-CD30L que comprende una HC que comprende SEQ ID NO: 33, 36 o 39 y una LC que comprende SEQ ID NO: 30. En una realización, la HC comprende SEQ ID NO: 33 y la LC comprende SEQ ID NO: 30. En una realización, el anticuerpo comprende dos HC y dos LC y en donde cada HC comprende SEQ ID NO: 33 y cada LC comprende SEQ ID NO: 30. En otra realización, la HC comprende SEQ ID NO: 36 y la LC comprende SEQ ID NO: 30. En una realización, el anticuerpo comprende dos HC y dos LC y en donde cada HC comprende SEQ ID NO: 36 y cada LC comprende SEQ ID NO: 30. En una realización adicional, la HC comprende SEQ ID NO: 39 y la LC comprende SEQ ID NO: 30. En una realización, el anticuerpo comprende dos HC y dos LC y en donde cada HC comprende SEQ ID NO: 39 y cada LC comprende SEQ ID NO: 30.

En el presente documento se proporciona también un anticuerpo anti-CD30L que comprende una HC que comprende SEQ ID NO: 25 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 26. Se proporciona un anticuerpo anti-CD30L que comprende dos HC y dos LC, en donde cada HC comprende SEQ ID NO:25 y cada LC comprende SEQ ID NO: 26 Se proporciona además un anticuerpo anti-CD30L que consiste en dos HC y dos LC, en donde cada HC consiste en SEQ ID NO:25 y cada LC consiste en SEQ ID NO: 26 También se proporciona un anticuerpo anti-CD30L que comprende una HC que comprende SEQ ID NO: 31, 34 o 37 y una LC que comprende SEQ ID NO: 26. En una realización, la HC comprende SEQ ID NO: 31 y la LC comprende SEQ ID NO: 26. En una realización, el anticuerpo comprende dos HC y dos LC y en donde cada HC comprende SEQ ID NO: 31 y cada LC comprende SEQ ID NO: 26. En una realización, la HC comprende SEQ ID NO: 34 y la LC comprende SEQ ID NO: 26. En una realización, el anticuerpo comprende dos HC y dos LC y en donde cada HC comprende SEQ ID NO: 34 y cada LC comprende SEQ ID NO: 26. En otra realización, la HC comprende SEQ ID NO: 37 y la LC comprende SEQ ID NO: 26. En una realización, el anticuerpo comprende dos HC y dos LC y en donde cada HC comprende SEQ ID NO: 37 y cada LC comprende SEQ ID NO: 26.

En una realización, los anticuerpos descritos en el presente documento (a) se unen a CD30L humano con un valor de constante de disociación (KD) inferior a 100, 75 o 50 picomolar medido mediante una técnica de resonancia plasmática de superficie o un ensayo cinético de

exclusión; (b) se unen a CD30L de cynomolgus con un valor de KD inferior a 100, 75 o 50 picomolar medido mediante una técnica de resonancia plasmática de superficie o un ensayo cinético de exclusión; (c) unirse al CD30L humano y al CD30L de cynomolgus con una afinidad de 10 veces entre sí; (d) bloquear la unión del CD30L humano al CD30 humano según se determine mediante un ensayo celular; o (e) inhibir la secreción de IL-8 inducida por CD30L según se determine mediante un ensayo celular.

En una realización de los anticuerpos de la presente divulgación, el anticuerpo une específicamente CD30L. Por ejemplo, se proporciona un anticuerpo que se une específicamente a CD30L que comprende un HCDR1 que comprende SEQ ID NO: 1, un HCDR2 que comprende SEQ ID NO: 2, un HCDR3 que comprende SEQ ID NO: 3, un LCDR1 que comprende SEQ ID NO: 4, un LCDR2 que comprende SEQ ID NO: 5 y un LCDR3 que comprende SEQ ID NO: 6. También se proporciona un anticuerpo que se une específicamente a CD30L que comprende un HCDR1 que comprende SEQ ID NO: 7, un HCDR2 que comprende SEQ ID NO: 8, un HCDR3 que comprende SEQ ID NO: 9, un LCDR1 que comprende SEQ ID NO: 10, un LCDR2 que comprende SEQ ID NO: 11 y un LCDR3 que comprende SEQ ID NO: 12.

La presente divulgación proporciona un método para tratar un trastorno inflamatorio en un paciente que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo de la presente divulgación. En una realización, el trastorno inflamatorio es el asma. En una realización, el trastorno inflamatorio es asma grave. En una realización, el trastorno inflamatorio es el lupus. En una realización, el trastorno inflamatorio es la colitis ulcerosa.

También se proporcionan moléculas polinucleotídicas aisladas que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada y/o la cadena ligera de cualquiera de los anticuerpos de la presente divulgación. En un aspecto se proporciona un polinucleótido que codifica: Una HCVR; una LCVR; una HC; una LC; una LCVR y una HCVR; o una LC y HC de un anticuerpo que se une a CD30L, en donde el anticuerpo comprende un HCDR1 que comprende SEQ ID NO: 1, un HCDR2 que comprende SEQ ID NO: 2, un HCDR3 que comprende SEQ ID NO: 3, un LCDR1 que comprende SEQ ID NO: 4, un LCDR2 que comprende SEQ ID NO: 5 y un LCDR3 que comprende SEQ ID NO: SEQ ID NO: SEQ ID NO: 6. En una realización, el anticuerpo comprende una HCVR que comprende SEQ ID NO: 19 y una LCVR que comprende SEQ ID NO: 20. En una realización, el anticuerpo comprende una HC que comprende SEQ ID NO: 25 y una LC que comprende SEQ ID NO: 26.

En una realización, el polinucleótido codifica una HCVR del anticuerpo, en donde la secuencia de aminoácidos de la HCVR comprende SEQ ID NO: 19 En una realización, el polinucleótido codifica la LCVR del anticuerpo, en donde la secuencia de aminoácidos de la LCVR comprende SEQ ID NO: 20 En una realización, el polinucleótido codifica tanto la HCVR como la LCVR del anticuerpo, en cuyo caso la secuencia de aminoácidos de la HCVR

comprende SEQ ID NO: 19 y la secuencia de aminoácidos de la LCVR comprende SEQ ID NO: 20.

En una realización, el polinucleótido codifica la HC del anticuerpo, en donde la secuencia de aminoácidos del HC comprende SEQ ID NO: 25 En una realización, el polinucleótido codifica el LC del anticuerpo, en donde la secuencia de aminoácidos del LC comprende SEQ ID NO: 26 En una realización, el polinucleótido codifica tanto la LC como la HC del anticuerpo, en donde la secuencia de aminoácidos de la HC comprende SEQ ID NO: 25 y la secuencia de aminoácidos de la LC comprende SEQ ID NO: 26.

En una realización, el polinucleótido que codifica el anticuerpo LC comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 18 En una realización, el polinucleótido que codifica el anticuerpo HC comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 21

También se proporciona en un aspecto un polinucleótido que codifica: Una HCVR; una LCVR; una HC; una LC; una LCVR y una HCVR; o una LC y una HC de un anticuerpo que se une a CD30L, en donde el anticuerpo comprende un HCDR1 que comprende SEQ ID NO: 7, un HCDR2 que comprende SEQ ID NO: 8, un HCDR3 que comprende SEQ ID NO: 9, un LCDR1 que comprende SEQ ID NO: 10, un LCDR2 que comprende SEQ ID NO: 11 y un LCDR3: 12. En una realización, el anticuerpo comprende una HCVR que comprende SEQ ID NO: 23 y una LCVR que comprende SEQ ID NO: 24. En una realización, el anticuerpo comprende una HC que comprende SEQ ID NO: 29 y una LC que comprende SEQ ID NO: 30.

En una realización, el polinucleótido codifica una HCVR del anticuerpo, en donde la secuencia de aminoácidos de la HCVR comprende SEQ ID NO: 23 En una realización, el polinucleótido codifica la LCVR del anticuerpo, en donde la secuencia de aminoácidos de la LCVR comprende SEQ ID NO: 24 En una realización, el polinucleótido codifica tanto la HCVR como la LCVR del anticuerpo, en cuyo caso la secuencia de aminoácidos de la HCVR comprende SEQ ID NO: 23 y la secuencia de aminoácidos de la LCVR comprende SEQ ID NO: 24.

En una realización, el polinucleótido codifica la HC del anticuerpo, en donde la secuencia de aminoácidos del HC comprende SEQ ID NO: 29 En una realización, el polinucleótido codifica el LC del anticuerpo, en donde la secuencia de aminoácidos del LC comprende SEQ ID NO: 30 En una realización, el polinucleótido codifica tanto la LC como la HC del anticuerpo, en donde la secuencia de aminoácidos de la HC comprende SEQ ID NO: 29 y la secuencia de aminoácidos de la LC comprende SEQ ID NO: 30.

En una realización, el polinucleótido que codifica el anticuerpo LC comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 16 En una realización, el polinucleótido que codifica el anticuerpo HC comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 17

En una realización, la presente divulgación proporciona un vector que comprende cualquiera de los polinucleótidos de la presente divulgación. En una realización, el vector es un

vector de expresión recombinante. En una realización, el vector comprende un polinucleótido que codifica: una HCVR; una LCVR; una HC; una LC; una LCVR y una HCVR; o una LC y HC de un anticuerpo que se une a CD30L, en donde el anticuerpo comprende un HCDR1 que comprende SEQ ID NO: 1, un HCDR2 que comprende SEQ ID NO: 2, un HCDR3 que
 5 comprende SEQ ID NO: 3, un LCDR1 que comprende SEQ ID NO: 4, un LCDR2 que comprende SEQ ID NO: 5 y un LCDR3 que comprende SEQ ID NO: 6. En una realización, el anticuerpo comprende una HCVR que comprende SEQ ID NO: 19 y una LCVR que comprende SEQ ID NO: 20. En una realización, el anticuerpo comprende una HC que comprende SEQ ID NO: 25 y una LC que comprende SEQ ID NO: 26.

10 En una realización, el vector comprende polinucleótido que codifica una HCVR del anticuerpo, en donde la secuencia de aminoácidos de la HCVR comprende SEQ ID NO: 19. En una realización, el vector comprende un polinucleótido que codifica la LCVR del anticuerpo, en donde la secuencia de aminoácidos de la LCVR comprende SEQ ID NO: 20. En una realización, el vector comprende un polinucleótido que codifica tanto la HCVR como la LCVR del anticuerpo,
 15 en donde la secuencia de aminoácidos de la HCVR comprende SEQ ID NO: 19 y la secuencia de aminoácidos de la LCVR comprende SEQ ID NO: 20.

En una realización, el vector comprende un polinucleótido que codifica la HC del anticuerpo, en donde la secuencia de aminoácidos la HC comprende SEQ ID NO: 25. En una realización, el vector comprende un polinucleótido que codifica la LC del anticuerpo, en donde
 20 la secuencia de aminoácidos de la LC comprende SEQ ID NO: 26. En una realización, el vector comprende un polinucleótido que codifica tanto la LC como la HC del anticuerpo, en donde la secuencia de aminoácidos de la HC comprende SEQ ID NO: 25 y la secuencia de aminoácidos de la LC comprende SEQ ID NO: 26.

En una realización, el vector comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo LC,
 25 en donde el polinucleótido que codifica la LC comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 18. En una realización, el vector comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo HC, en donde el polinucleótido que codifica la HC comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 21

También se proporciona un vector que comprende un polinucleótido que codifica: una
 30 HCVR; una LCVR; una HC; una LC; una LCVR y una HCVR; o una LC y una HC de un anticuerpo que se une a CD30L, en donde el anticuerpo comprende un HCDR1 que comprende SEQ ID NO: 7, un HCDR2 que comprende SEQ ID NO: 8, un HCDR3 que comprende SEQ ID NO: 9, un LCDR1 que comprende SEQ ID NO: 10, un LCDR2 que comprende SEQ ID NO: 11 y un LCDR3 que comprende SEQ ID NO: 12 En una realización, el anticuerpo comprende una
 35 HCVR que comprende SEQ ID NO: 23 y una LCVR que comprende SEQ ID NO: 24. En una realización, el anticuerpo comprende una HC que comprende SEQ ID NO: 29 y una LC que comprende SEQ ID NO: 30.

En una realización, el vector comprende un polinucleótido que codifica una HCVR del anticuerpo, en donde la secuencia de aminoácidos de la HCVR comprende SEQ ID NO: 23. En una realización, el vector comprende un polinucleótido que codifica la LCVR del anticuerpo, en donde la secuencia de aminoácidos de la LCVR comprende SEQ ID NO: 24. En una realización, el vector comprende un polinucleótido que codifica tanto la HCVR como la LCVR del anticuerpo, en donde la secuencia de aminoácidos de la HCVR comprende SEQ ID NO: 23 y la secuencia de aminoácidos de la LCVR comprende SEQ ID NO: 24.

En una realización, el vector comprende un polinucleótido que codifica la HC del anticuerpo, en donde la secuencia de aminoácidos de la HC comprende SEQ ID NO: 29. En una realización, el vector comprende un polinucleótido que codifica la LC del anticuerpo, en donde la secuencia de aminoácidos de la LC comprende SEQ ID NO: 30. En una realización, el vector comprende un polinucleótido que codifica tanto la LC como la HC del anticuerpo, en donde la secuencia de aminoácidos de la HC comprende SEQ ID NO: 29 y la secuencia de aminoácidos de la LC comprende SEQ ID NO: 30.

En una realización, el vector comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo LC, en donde el polinucleótido que codifica la LC comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 16. En una realización, el vector comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo HC, en donde el polinucleótido que codifica el anticuerpo HC comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 17.

La presente divulgación proporciona una célula huésped que comprende cualquiera de los polinucleótidos de la presente divulgación o que comprende cualquiera de los vectores de la presente divulgación. En una realización, se proporciona una célula huésped en la que se ha introducido un vector de la presente divulgación. En una realización, la célula huésped comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo HC, en donde la secuencia de aminoácidos de la HC comprende SEQ ID NO: 25. En una realización, la célula huésped comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo LC, en donde la secuencia de aminoácidos de LC comprende SEQ ID NO: 26. En una realización, se proporciona una célula huésped que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo HC y un anticuerpo LC, en donde la secuencia de aminoácidos de la HC comprende SEQ ID NO: 25 y la secuencia de aminoácidos de la LC comprende SEQ ID NO: 26. La presente divulgación también proporciona un proceso para producir un anticuerpo que comprende dos HC y dos LC, en donde el proceso comprende (i) cultivar la célula huésped de la presente divulgación en condiciones tales como que se exprese el anticuerpo y (ii) recuperar el anticuerpo expresado. En una realización, cada HC comprende SEQ ID NO: 25 y cada LC comprende SEQ ID NO: 26. La presente divulgación también proporciona un anticuerpo obtenible mediante dicho proceso.

En una realización, la célula huésped comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo HC, en donde la secuencia de aminoácidos del HC comprende SEQ ID NO:29. En una realización, la célula huésped comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo LC, en donde la secuencia de aminoácidos del LC comprende SEQ ID NO: 30. En una realización, se proporciona una célula huésped que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo HC y un anticuerpo LC, en donde la secuencia de aminoácidos de la HC comprende SEQ ID NO: 29 y la secuencia de aminoácidos de la LC comprende SEQ ID NO: 30. La presente divulgación también proporciona un proceso para producir un anticuerpo que comprende dos HC y dos LC, en donde el proceso comprende (i) cultivar la célula huésped de la presente divulgación en condiciones tales como que se exprese el anticuerpo y (ii) recuperar el anticuerpo expresado. En una realización, cada HC comprende SEQ ID NO: 29 y cada LC comprende SEQ ID NO: 30. La presente divulgación también proporciona un anticuerpo obtenible mediante dicho proceso.

La presente divulgación proporciona un anticuerpo de la presente divulgación para su uso en terapia.

La presente divulgación proporciona un anticuerpo de la presente divulgación para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio. En una realización, el trastorno inflamatorio es el asma. En una realización, el trastorno inflamatorio es el lupus. En una realización, el trastorno inflamatorio es la colitis ulcerosa.

La presente divulgación proporciona un anticuerpo de la presente divulgación para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno inflamatorio. En una realización, el trastorno inflamatorio es el asma. En una realización, el trastorno inflamatorio es el lupus. En una realización, el trastorno inflamatorio es la colitis ulcerosa.

La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la presente divulgación y uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente divulgación proporciona anticuerpos anti-CD30L y métodos de fabricación y uso de dichos anticuerpos. Los anticuerpos de la presente divulgación demuestran características mejoradas, tales como características relacionadas con la estabilidad, en comparación con otros anticuerpos que se evaluaron durante la generación de anticuerpos. Tras un cribado inicial de más de 3,500 anticuerpos, se evaluaron 368 clones para determinar su actividad funcional de unión a CD30L y también para bloquear la interacción CD30 (receptor) y CD30L (ligando) mediante un ensayo basado en células que mide la secreción de IL-8. De esos 368 clones, veintidós unían con gran afinidad el CD30L nativo expresado en células T primarias humanas y de mono cynomolgus. Estos veintidós clones se sometieron a diversas herramientas

de análisis *in silico* y se eligieron doce clones para someterlos a ingeniería de optimización adicional. Estos doce anticuerpos se sometieron a un extenso proceso de remediación de puntos calientes mediante una plataforma de cribado por visualización en levadura que analizó un total de 395 variantes Fab mutantes combinatorias que se sometieron a pruebas de unión a

5 CD30L mediante métodos de visualización en levadura. A continuación, nueve anticuerpos se convirtieron en IgG1-SEFL2-YTE y se analizaron mediante cinco ensayos celulares diferentes antes y después del estrés térmico y el estrés lumínico. Estos nueve anticuerpos también se sometieron a pruebas de caracterización bioquímica y biofísica para, en parte, determinar su solubilidad, viscosidad, estabilidad química, estabilidad física y fotoestabilidad. De estos nueve

10 anticuerpos, los anticuerpos 46265 y 46183 demostraron propiedades físico-químicas deseables y fueron más estables en comparación con los otros anticuerpos que mostraron propiedades no deseables, incluyendo alta viscosidad, Baja actividad, clipping de anticuerpos y/o problemas de solubilidad y agregación después de un salto de pH. Los nueve anticuerpos se agrupan, lo que indica que se unen al mismo epítipo o a epítipos similares entre sí y, sin

15 embargo, tras una importante labor de ingeniería y cribado, sólo los anticuerpos 46265 y 46183 demostraron tener las propiedades deseadas para una posible terapia.

En una realización, los anticuerpos anti-CD30L divulgados en el presente documento (i) unen específicamente CD30L humano y CD30L de mono cynomolgus con una afinidad 10 veces mayor entre sí y en el intervalo picomolar bajo; (ii) demuestran valores IC50 picomolares en un

20 ensayo funcional; (iii) demuestran una semivida aumentada; y/o (iv) demuestran propiedades fisicoquímicas aceptables tales como niveles aceptables de viscosidad y estabilidad.

Tal como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina que comprende 2 cadenas pesadas (HCs) y 2 cadenas ligeras (LCs) interconectadas por enlaces disulfuro. La porción aminoterminal de cada LC y HC incluye una

25 región variable de aproximadamente 100-120 aminoácidos, responsable principalmente del reconocimiento de antígenos a través de las CDRs que contiene. Las CDRs están separadas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco ("FR"). Cada LCVR y HCVR se compone de 3 CDRs y 4 FRs, dispuestas del extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Los 3 CDR de la LC se refieren a

30 "LCDR1, LCDR2, y LCDR3," y los 3 CDRs de la HC se refieren a "HCDR1, HCDR2, y HCDR3." Las CDRs contienen la mayoría de los restos que forman interacciones específicas con el antígeno. Por lo tanto, la capacidad funcional de un anticuerpo para unirse a un antígeno particular depende en gran medida de los restos de aminoácidos presentes en las seis CDRs. La asignación de aminoácidos a dominios CDR dentro de las regiones LCVR y HCVR de los

35 anticuerpos de la presente divulgación, a menos que se indique lo contrario, se basa en la convención de numeración de Kabat bien conocida (Kabat, *et al.*, Ann. NY Acad. SCI. 190:382-93 (1971); Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición,

Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Publicación NIH n.º 91-3242 (1991)). Se entiende que también se pueden utilizar otras convenciones de numeración, tales como, por ejemplo, Chothia (Chothia *et al.*, "Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins", *Journal of Molecular Biology*, 196, 901-917 (1987); Al-Lazikani *et al.*, "Standard Conformations for the canonical Structures of Immunoglobulins", *Journal of Molecular Biology*, 273, 927-948 (1997)) y/o North (North *et al.*, "A New Clustering of Antibody CDR Loop Formations", *Journal of Molecular Biology*, 406, 228-256 (2011)).

Un «anticuerpo anti-CD30L» es un anticuerpo que une CD30L. En una realización, el anticuerpo anti-CD30L une específicamente CD30L. Se dice que una proteína de unión a antígeno se «une específicamente» a un antígeno cuando la proteína de unión a antígeno se une al antígeno con una constante de disociación (KD) es $\leq 10^{-7}$ M medida mediante una técnica de resonancia plasmática de superficie (por ejemplo, BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Suecia) o un ensayo cinético de exclusión (KinExA, Sapidyne, Boise, Idaho). En una realización, el anticuerpo anti-CD30L se une específicamente a CD30L humano. En una realización, el anticuerpo anti-CD30L se une específicamente al CD30L del mono cynomolgus (cyno). En una realización, el anticuerpo anti-CD30L se une específicamente a CD30L humano con una afinidad que está dentro de 10 veces la afinidad de unión del anticuerpo anti-CD30L que se une a CD30L de mico cynomolgus. Los anticuerpos, polipéptidos y otras moléculas de la presente divulgación están «aislados» cuando existen en un medio físico distinto de aquel en donde se produjeron o se producirían de forma natural.

También se contemplan como parte de la presente divulgación los Fabs, scFabs y scFvs que comprenden los CDR de los anticuerpos anti-CD30L de la presente divulgación. También se contemplan como parte de la presente divulgación los Fabs y scFvs que comprenden las regiones variables (LCVR y/o HCVR) de los anticuerpos anti-CD30L de la presente divulgación.

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden ser IgG1, IgG2 o IgG4. Los anticuerpos de la presente divulgación pueden ser humanos o humanizados. En el contexto de los anticuerpos monoclonales, los términos "humano" y "humanizado" son bien conocidos por los expertos en la técnica (Weiner L J, *J. Immunother.* 2006; 29: 1-9; Mallbris L, *et al.*, *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* 2016; 9: 13-15).

Los anticuerpos de la presente divulgación, por ejemplo anticuerpos IgG1, pueden tener YTE (numeración UE M252Y, S254T y T256E) para aumentar la semivida del anticuerpo y/o mutaciones SEFL2 (numeración UE R292C, N297G y V302C) para reducir o eliminar la función efectora. Los anticuerpos que contienen mutaciones YTE y/o SEFL2, así como los anticuerpos que no contienen ni mutaciones YTE ni SEFL2, se contemplan como parte de la presente divulgación. Dichos anticuerpos también pueden tener una abrazadera de cisteína añadida para aumentar la estabilidad tras la eliminación de un sitio de glicosilación.

Por "secuencia de ácido nucleico" se entiende un polímero de ADN o ARN, es decir, un polinucleótido, que puede ser monocatenario o bicatenario y que puede contener nucleótidos no naturales o alterados. Los términos "ácido nucleico", "molécula de ácido nucleico", "secuencia de ácido nucleico" y "polinucleótido" pueden utilizarse indistintamente en el presente documento para referirse a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean ribonucleótidos (ARN) o desoxirribonucleótidos (ADN). Estos términos se refieren a la estructura primaria de la molécula y, por lo tanto, incluyen el ADN bicatenario y monocatenario, y el ARN bicatenario y monocatenario. El término «secuencia de ácido nucleico modificada» incluye, como equivalentes, análogos de ARN o ADN fabricados a partir de análogos de nucleótidos y polinucleótidos modificados tales como, aunque sin limitarse a ellos, polinucleótidos metilados y/o capados. Los polinucleótidos de la presente divulgación incluyen moléculas de ADN que comprenden una secuencia polinucleotídica no natural que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de al menos uno de los polipéptidos de un anticuerpo anti-CD30L de la presente divulgación (por ejemplo, una cadena pesada, una cadena ligera, una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera).

Un ADN aislado que codifica una región HCVR puede convertirse en un gen de cadena pesada de longitud completa uniendo operativamente el ADN que codifica HCVR con otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada. Las secuencias de genes de la región constante de cadena pesada en seres humanos, así como en otros mamíferos, son conocidas en la técnica. Pueden obtenerse fragmentos de ADN que abarcan estas regiones, por ejemplo, mediante la amplificación por PCR convencional.

Un ADN aislado que codifica una región LCVR puede convertirse en un gen de cadena ligera de longitud completa uniendo operativamente el ADN que codifica LCVR con otra molécula de ADN que codifica una región constante de cadena ligera. Las secuencias de genes de la región constante de cadena ligera en seres humanos, así como en otros mamíferos, son conocidas en la técnica. Pueden obtenerse fragmentos de ADN que abarcan estas regiones mediante la amplificación por PCR convencional. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda. En algunas realizaciones, la región constante de cadena ligera es una región constante kappa.

El término "que codifica" o "codifica" se refiere a una secuencia polinucleotídica que codifica uno o más aminoácidos. El término no requiere un codón de inicio o de parada. La presente divulgación abarca moléculas de ácido nucleico que codifican secuencias polipeptídicas de anticuerpos anti-CD30L, incluyendo las que codifican la región variable de la cadena pesada, la región variable de la cadena ligera, la cadena pesada y la cadena ligera.

Los polinucleótidos de la presente divulgación pueden expresarse en una célula huésped después de que las secuencias se hayan unido de forma operable a una secuencia de control de expresión. Estos vectores de expresión suelen replicarse en los organismos

huéspedes como episomas o como parte integrante del ADN cromosómico del huésped. Comúnmente, los vectores de expresión contendrán marcadores de selección, por ejemplo, tetraciclina, neomicina y dihidrofolato reductasa, para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas.

5 Las células transformadas pueden cultivarse en condiciones que promuevan la expresión del polipéptido y el polipéptido puede recuperarse mediante procedimientos convencionales de purificación de proteínas. Los polipéptidos contemplados para su uso en el presente documento incluyen polipéptidos de mamífero recombinantes sustancialmente homogéneos sustancialmente libres de materiales endógenos contaminantes. Las células que
10 contienen ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo anti-CD30L de la presente divulgación también incluyen hibridomas.

Un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti-CD30L de la presente divulgación puede tener cualquier longitud según sea apropiado para el uso o función deseados, y puede comprender una o más secuencias adicionales, por ejemplo,
15 secuencias reguladoras, y/o formar parte de un ácido nucleico mayor, por ejemplo, un vector. El experto en la técnica apreciará que, debido a la degeneración del código genético, cada una de las secuencias polipeptídicas dadas a conocer en el presente documento se codifica por un gran número de otras secuencias de ácidos nucleicos. También pueden introducirse mutaciones en un ácido nucleico sin alterar significativamente la actividad biológica de un polipéptido que
20 codifica. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de nucleótidos que conducen a sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos no esenciales.

Se apreciará que un anticuerpo anti-CD30L de la presente divulgación puede tener al menos una sustitución de aminoácidos, con la condición de que el anticuerpo anti-CD30L retenga la misma o mejor especificidad de unión deseada (por ejemplo, unión a CD30L). Por lo
25 tanto, las modificaciones del anticuerpo anti-CD30L están incluidas en el alcance de la divulgación. Dichas modificaciones pueden incluir sustituciones de aminoácidos, que pueden ser conservadoras o no conservadoras y que no destruyen la capacidad de unión deseada de una constructo de unión. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos pueden abarcar residuos de aminoácidos de origen no natural, que típicamente se incorporan mediante síntesis
30 de péptidos químicos en vez de síntesis en sistemas biológicos. Estos incluyen peptidomiméticos y otras formas invertidas o invertidas de restos de aminoácidos. Una sustitución conservadora de aminoácidos también puede implicar una sustitución de un resto de aminoácido nativo por un resto normativo de modo que haya poco o ningún efecto sobre la polaridad o carga del resto de aminoácido en esa posición.

35 CD30L humano consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40. CD30L del mono *Cynomolgus* consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41.

El término "variante", tal como se utiliza aquí con respecto a una secuencia de ácido nucleico, significa (i) una porción o fragmento de una secuencia de nucleótidos de referencia; (ii) el complemento de una secuencia de nucleótidos de referencia o una porción de la misma; (iii) un ácido nucleico que es sustancialmente idéntico a un ácido nucleico de referencia o a su
 5 complemento; o (iv) un ácido nucleico que se hibrida en condiciones estrictas con el ácido nucleico de referencia, su complemento o secuencias sustancialmente idénticas. Con respecto a un péptido o polipéptido, el término "variante", tal como se utiliza aquí, se refiere a un péptido o polipéptido que difiere de un péptido o polipéptido de referencia en la secuencia de aminoácidos por la inserción, delección o sustitución conservadora de aminoácidos, pero que
 10 conserva al menos una actividad biológica del péptido o polipéptido de referencia. Variante también puede significar una proteína con una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a una proteína de referencia con una secuencia de aminoácidos que conserva al menos una actividad biológica. El término "isoforma" puede utilizarse aquí para referirse a una variante polipeptídica o proteica. Normalmente, una isoforma proteínica es un
 15 miembro de un conjunto de proteínas muy similares que se originan en un único gen o familia de genes y que son el resultado de diferencias genéticas. Aunque algunas isoformas proteínicas presentan las mismas o similares funciones biológicas, algunas isoformas tienen funciones únicas. Las isoformas pueden generarse a partir del corte y empalme alternativo, el uso variable del promotor u otras modificaciones postranscripcionales de un único gen.

Una variante puede ser una secuencia de ácido nucleico que sea sustancialmente idéntica en toda la longitud de una secuencia génica completa o un fragmento de la misma. La secuencia de ácido nucleico puede ser 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica en toda la longitud de la secuencia genética o de un fragmento de la misma. En otras realizaciones, una variante
 25 puede ser una secuencia de aminoácidos que sea sustancialmente idéntica en toda la longitud de la secuencia de aminoácidos o en un fragmento de la misma. La secuencia de aminoácidos puede ser 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica en toda la longitud de la secuencia de aminoácidos o de un fragmento de la misma. En una realización, la variante de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo especificado es una en la que la variación se produce fuera de
 30 las CDR de los anticuerpos, tales variaciones se producen en la región marco de la HCVR, la LCVR o tanto la HCVR como la LCVR. En otra realización, la variante de la secuencia de aminoácidos especificada es una en la que la variación se produce fuera de las CDR de los anticuerpos, tales como variaciones que se producen en la región marco de la HCVR, la LCVR, o tanto la HCVR como la LCVR y en la que el anticuerpo conserva los residuos que fueron
 35 mutados durante la reparación de puntos calientes del anticuerpo.

"Identidad de secuencia" se refiere a la relación entre dos o más secuencias de aminoácidos (polipéptidos o proteínas) o dos o más secuencias de ácidos nucleicos

(polinucleótidos), determinada mediante la comparación de las secuencias. La identidad entre dos secuencias se define preferentemente evaluando su identidad en toda la longitud de la secuencia, tal como se identifica en el presente documento.

Al comparar la identidad de dos o más secuencias nucleotídicas o de aminoácidos, el porcentaje de identidad de secuencia entre una primera secuencia y una segunda secuencia se puede calcular mediante el uso de métodos conocidos por una persona experta en la técnica, por ejemplo, dividiendo el número de residuos en la primera secuencia que son idénticos a los residuos en las posiciones correspondientes en la segunda secuencia entre el número total de residuos en la primera secuencia y multiplicando por 100%, o utilizando un algoritmo informático conocido para la alineación de secuencias tal como NCBI Blast, por ejemplo, BLASTN y BLASTP (Altschul, S. F. *et al*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990), el paquete de programa GCG (Devereux, J., *et al*, *Nucleic Acids Research* 12 (1): 387 (1984)), BestFit, FASTA y EMBOSS Needle (Madeira, F., *et al*, *Nucleic Acids Research* 47(W1): W636-W641 (2019)).

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden producirse fácilmente en células de mamífero, ejemplos no limitantes de las cuales incluyen células CHO, NSO, HEK293 o COS. Las células hospedadoras se cultivan usando técnicas bien conocidas en la técnica.

Los vectores que contienen las secuencias polinucleotídicas de interés (por ejemplo, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos del anticuerpo y las secuencias de control de la expresión) pueden transferirse a la célula hospedadora mediante métodos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de hospedador celular. Los ejemplos de vectores incluyen, pero sin limitarse a, plásmidos, vectores virales, vectores de mamíferos no episómicos y vectores de expresión, por ejemplo, vectores de expresión recombinantes.

Los vectores de expresión recombinante de la divulgación pueden comprender un ácido nucleico de la divulgación en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula huésped. Los vectores de expresión recombinante incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas en función de las células huésped que se van a utilizar para la expresión, que está operablemente unida a la secuencia de ácido nucleico que se va a expresar. Las secuencias reguladoras incluyen las que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células huésped (por ejemplo, el potenciador del gen temprano SV40, el promotor del virus del sarcoma de Rous y el promotor del citomegalovirus), las que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solo en determinadas células huésped (por ejemplo, secuencias reguladoras de tejidos específicos, véase Voss *et al.*, 1986, *Trends Biochem. Sci.* 11:287, Maniatis *et al.*, 1987, *Science* 236:1237, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia) y las que dirigen la expresión inducible de una secuencia de nucleótidos como respuesta a un tratamiento o afección particular (por ejemplo, el promotor de metalotionina en células de mamífero y el promotor que responde a tet y/o que responde a la estreptomicina en sistemas tanto procariotas como eucariotas (véase *id.*)).

Normalmente, los vectores de expresión utilizados en cualquiera de las células huésped contendrán secuencias para el mantenimiento de plásmidos y para la clonación y expresión de secuencias de nucleótidos exógenos. Tales secuencias, denominadas colectivamente "secuencias de flaqueo" en determinadas realizaciones, incluirán típicamente una o más de las siguientes secuencias de nucleótidos: un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación transcripcional, una secuencia intrónica completa que contenga un sitio de empalme donante y aceptor, una secuencia que codifica una secuencia líder para la secreción del polipéptido, un sitio de unión a ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región polienlazadora para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido que se va a expresar, y un elemento marcador seleccionable. La secuencia líder puede comprender SEQ ID NO: 32 (MDMRVPAQLLLLLWLRGARC) que puede estar codificada por la SEQ ID NO: 28 (atggacatgagtgctgcacagctgctgggctgctgctgctgctgctgagaggcgccccagatgc). La secuencia líder puede comprender SEQ ID NO: 27 (MAWALLLLTLTQGTGSWA) que puede estar codificada por la SEQ ID NO: 22 (atggcctggg ctctgct ccctcacctc ctactcagg gcacagggtc ctgggcc).

Se pueden emplear diversos métodos de purificación de proteínas, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos, y dichos métodos son conocidos en la técnica.

Los anticuerpos anti-CD30L de la presente divulgación pueden biosintetizarse, purificarse y formularse para su administración mediante métodos bien conocidos. Por ejemplo, una célula hospedadora apropiada, tal como HEK 293 o CHO, se transfecta de forma transitoria o estable con un sistema de expresión para secretar anticuerpos usando una relación predeterminada de vectores HC:LC si se usan dos vectores, o un único sistema de vectores que codifica tanto la cadena pesada como la cadena ligera. Los vectores adecuados para la expresión y secreción de anticuerpos de estas células hospedadoras utilizadas habitualmente son bien conocidos. Después de la expresión y secreción del anticuerpo, el medio se clarifica para retirar las células y el medio clarificado se purifica usando cualquiera de muchas técnicas habitualmente utilizadas. Por ejemplo, el medio puede aplicarse a una columna de proteína A o G que se ha equilibrado con un tampón, tal como la solución salina tamponada con fosfato (pH 7.4). La columna se lava para retirar componentes de unión no específicos. El anticuerpo unido se eluye, por ejemplo, mediante un gradiente de pH (tal como el tampón de fosfato de sodio 0.1

M, pH 6.8, hasta el tampón de citrato de sodio 0.1 M, pH 2.5). Las fracciones de anticuerpos se detectan, tal como, mediante SDS-PAGE, y después se agrupan. La purificación adicional es opcional, dependiendo del uso previsto. El anticuerpo puede concentrarse y/o filtrarse de forma estéril usando las técnicas habituales. Otros materiales distintos del anticuerpo, tales como los componentes de la célula hospedadora y del medio de crecimiento, y los agregados y multímeros solubles del anticuerpo, pueden reducirse o retirarse eficazmente mediante técnicas comunes, incluyendo la exclusión por tamaño. interacción hidrófoba, intercambio catiónico, intercambio aniónico, afinidad o cromatografía de hidroxapatita. La pureza del anticuerpo después de estas etapas cromatográficas es normalmente superior al 95 %. El producto puede congelarse a -70 °C o liofilizarse.

En aspectos a modo de ejemplo, un anticuerpo de la presente divulgación comprende un HC que comprende una lisina C-terminal, como en SEQ ID NO: 25, 29, 34, y 36. En aspectos alternativos, el anticuerpo comprende una HC sin la lisina C terminal, tal como en las SEQ ID NO: 31, 33, 37 y 39. Además, la glutamina N-terminal y/o el ácido glutámico N-terminal de la HC pueden convertirse en ácido piroglutámico, como en las SEQ ID NO: 34, 36, 37 y 39. Cualquiera de las dos formas está prevista para los anticuerpos de la presente divulgación.

Se prevé que un anticuerpo anti-CD30L de la presente divulgación, o una composición farmacéutica que lo comprenda, trate enfermedades inflamatorias. Las enfermedades inflamatorias incluyen, entre otras, enfermedades autoinmunes como el asma (incluida el asma grave), la artritis reumatoide, el lupus y la esclerosis múltiple, la colitis ulcerosa y la dermatitis atópica.

La artritis puede tratarse con los métodos y composiciones divulgados en el presente documento. Tal como se utiliza aquí, el término "artritis" se refiere a afecciones inflamatorias crónicas que afectan principalmente a las articulaciones o al tejido conjuntivo que las rodea, aunque también pueden verse afectados diversos órganos del cuerpo.

La artritis puede ser de origen autoinmune o traumático, o puede desencadenarse por la exposición a un antígeno extraño, dando lugar posteriormente a una enfermedad crónica que ya no depende de la presencia continuada del antígeno desencadenante. El término "artritis", tal como se utiliza aquí, incluye: artritis deformante; osteoartritis; artritis reumatoide (adulta y juvenil); artritis de la enfermedad de Lyme; artritis reactiva, incluyendo la enfermedad de Reiter; artritis psoriásica; artritis nodosa; espondiloartropatías seronegativas, **incluyendo**, entre otras, la espondilitis anquilosante.

Los anticuerpos descritos **en el presente documento** son útiles en el tratamiento de diversos trastornos reumáticos, que se definen aquí como cualquier trastorno crónico que implique inflamaciones dolorosas y, a menudo, múltiples inflamaciones localizadas en las articulaciones, los músculos, los nervios, los tendones, la piel, los ojos, los tejidos conjuntivos u otros sistemas orgánicos diversos. Estos incluyen, pero no se limitan a los siguientes: artritis;

esclerodermia; gota; lupus eritematoso sistémico; polimialgia reumática; enfermedad de Still; uveítis crónica; trastornos que producen inflamación del músculo voluntario, incluyendo la dermatomiositis y la polimiositis, incluyendo la miositis esporádica por cuerpos de inclusión. El lupus eritematoso sistémico puede causar inflamación de las articulaciones, la piel, los riñones, el corazón, los pulmones, los vasos sanguíneos y el cerebro. En sus formas avanzadas, el lupus eritematoso sistémico puede provocar insuficiencia renal.

También se proporcionan métodos para utilizar los anticuerpos descritos en el presente documento en terapias para tratar diversos trastornos del sistema endocrino, incluyendo pero no limitado a: diabetes juvenil o de aparición en la madurez (incluyendo tipos de diabetes autoinmunes, insulinodependientes; tipos no insulinodependientes y diabetes mediada por obesidad); atrofia suprarrenal idiopática; enfermedad de Addison; hipotiroidismo; enfermedad de Grave; tiroiditis autoinmune, tal como la tiroiditis de Hashimoto; y síndromes autoinmunes poliglandulares (tipos I y II).

Los anticuerpos descritos en el presente documento también son útiles en terapias para tratar afecciones del sistema gastrointestinal, incluyendo, entre otras: colangitis esclerosante autoinmune; enfermedad celíaca; enfermedades inflamatorias intestinales, incluyendo enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa; pancreatitis autoinmune, incluyendo pancreatitis crónica; gastroparesia idiopática; y úlceras idiopáticas, incluyendo úlceras gástricas y duodenales.

También se incluyen métodos para utilizar los anticuerpos descritos en el presente documento en terapias que tratan trastornos del sistema genitourinario, tal como la glomerulonefritis autoinmune e idiopática; y la prostatitis idiopática crónica (no bacteriana), incluyendo la hipertrofia prostática benigna.

También se proporcionan métodos para utilizar los anticuerpos descritos en el presente documento en terapias para tratar diversos trastornos hematológicos, incluyendo pero no limitado a: anemias y trastornos hematológicos, incluyendo anemia perniciosa y anemia aplásica, y anemia aplásica de Fanconi; anemia hemolítica autoinmune; púrpura trombocitopénica idiopática (ITP); síndromes mielodisplásicos (incluyendo anemia refractaria, anemia refractaria con sideroblastos en anillo, anemia refractaria con exceso de blastos, anemia refractaria con exceso de blastos en transformación); y síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS).

Los anticuerpos **divulgados** son además útiles para tratar enfermedades que afectan al hígado, tal como la hepatitis autoinmune o inflamatoria crónica.

Además, los anticuerpos divulgados y su combinación se utilizan para tratar diversos trastornos autoinmunes o inflamatorios crónicos que implican pérdida de audición. Una de ellas es la pérdida de audición asociada al oído interno o al nervio coclear que se cree que es el resultado de un proceso autoinmune, es decir, la pérdida de audición autoinmune. Esta

enfermedad se trata actualmente con esteroides, metotrexato y/o ciclofosfamida, que pueden administrarse simultáneamente con un inhibidor o bloqueador de la interacción CD30/CD30L.

También pueden tratarse con los anticuerpos divulgados diversos trastornos pulmonares inflamatorios, incluyendo la linfangioleiomiomatosis idiopática, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) asociada a la bronquitis crónica no infecciosa o al enfisema, y las enfermedades pulmonares fibróticas, tal como la fibrosis quística y la fibrosis pulmonar idiopática.

Los trastornos asociados a los trasplantes también pueden tratarse con los anticuerpos divulgados, incluyendo la enfermedad de injerto contra huésped. Para prevenir o mejorar la enfermedad de injerto contra huésped, las composiciones que comprenden uno o más de los anticuerpos divulgados pueden administrarse antes, concomitantemente o después de un trasplante de médula ósea u órgano sólido, incluyendo el trasplante de corazón, hígado, pulmón, piel, riñón u otros órganos.

Los anticuerpos divulgados también son útiles para tratar enfermedades oculares inflamatorias crónicas, incluyendo la uveítis autoinmune.

Dichos anticuerpos también serían útiles para tratar enfermedades asociadas a la inflamación de las vías respiratorias, tal como el asma.

Los anticuerpos descritos en el presente documento también son útiles para tratar trastornos inflamatorios que afectan al sistema reproductor femenino, incluyendo: fallo de implante múltiple/infertilidad; síndrome de pérdida fetal o pérdida embrionaria IV (aborto espontáneo); y endometriosis.

Otros trastornos médicos tratables con los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen la inflamación crónica y/o las enfermedades degenerativas del sistema nervioso central. Se trata, por ejemplo, de enfermedades asociadas a la desmielinización, tal como la esclerosis múltiple, la esclerosis sistémica y los síndromes de Guillain-Barré (que incluyen la polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda, la neuropatía axonal motora aguda, la neuropatía axonal sensitiva motora aguda y el síndrome de Fisher). La esclerosis múltiple es representativa de una enfermedad degenerativa crónica del sistema nervioso central que puede tratarse con un agente capaz de inhibir o bloquear la interacción de CD30 y CD30L.

Otras afecciones inflamatorias crónicas tratables con los anticuerpos divulgados incluyen la enfermedad de la aglutinina fría; el síndrome de Behcet; el síndrome de Sjogren; y la tenosinovitis idiopática, así como diversos trastornos inflamatorios crónicos asociados a deficiencias hereditarias. Los inhibidores, las composiciones y las terapias combinadas son además útiles para tratar la parálisis de Bell (parálisis facial idiopática); el síndrome de fatiga crónica (no asociado a una infección en curso); la enfermedad degenerativa crónica del disco vertebral; el síndrome de la guerra del Golfo; y la miastenia gravis, que puede tratarse simultáneamente con corticosteroides.

Los trastornos que afectan a la piel o a las mucosas también pueden tratarse con los anticuerpos descritos en el presente documento. Estos incluyen: enfermedades acantolíticas, incluyendo lupus discoide, lupus eritematoso cutáneo subagudo, vasculitis cutánea, enfermedad de Darier, queratosis folicular, pénfigo vulgar y pénfigo paraneoplásico; acné rosácea; alopecia areata; penfigoide ampoloso; eccema; eritema, incluyendo eritema multiforme y eritema multiforme bulloso (síndrome de Stevens-Johnson); enfermedades inflamatorias de la piel; liquen plano; enfermedad ampollosa lineal por IgA (dermatosis ampollosa crónica de la infancia); pérdida de elasticidad de la piel; dermatitis neutrofílica (síndrome de Sweet); pitiriasis rubra pilaris; psoriasis; pioderma gangrenoso; pérdida de elasticidad de la piel; y necrosis epidérmica tóxica.

Otras enfermedades que pueden tratarse con los anticuerpos divulgados son: candidiasis mucocutánea crónica autoinmune; alergias; sarcoidosis; reticulohistiocitosis multicéntrica; granulomatosis de Wegener; arteritis, incluida la arteritis de células gigantes; vasculitis y miocarditis autoinmune crónica.

Un anticuerpo anti-CD30L de la presente divulgación, o una composición farmacéutica que comprenda el mismo, puede administrarse por vía parenteral, de la que son ejemplos no limitantes la administración subcutánea y la administración intravenosa. Un anticuerpo anti-CD30L de la presente divulgación puede administrarse a un paciente con portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables en dosis únicas o múltiples. Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden prepararse por métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22a ed. (2012), A. Lloyd et al., Pharmaceutical Press) y comprenden un anticuerpo, como se divulga en el presente documento, y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Como se usan indistintamente en el presente documento, "tratamiento" y/o "que trata" y/o "tratar" pretenden referirse a todos los procesos en donde puede haber una ralentización, interrupción, detención, control, parada o reversión de la progresión de los trastornos descritos en el presente documento, pero no indican necesariamente una eliminación total de todos los síntomas del trastorno. El tratamiento incluye la administración de un anticuerpo anti-CD30L de la presente divulgación para el tratamiento de una enfermedad o afección en un humano que se beneficiaría de la actividad de un anticuerpo anti-CD30L de la presente divulgación, e incluye: (a) inhibir la progresión de la enfermedad; y (b) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o el trastorno o aliviar los síntomas o las complicaciones de los mismos.

Pueden administrarse cantidades (o dosis) terapéuticamente eficaces de un anticuerpo anti-CD30L de la presente divulgación. La cantidad de anticuerpo anti-CD30L que constituye una dosis terapéutica puede variar con la indicación tratada, el peso del paciente, el área de superficie de piel calculada del paciente. La dosis de un anticuerpo anti-CD30L puede ajustarse

para conseguir los efectos deseados. En muchos casos, puede ser necesario administrar dosis repetidas. Las dosis y la frecuencia de administración pueden variar de acuerdo con factores tales como la vía de administración, el anticuerpo anti-CD30L particular empleado, la naturaleza y la gravedad de la enfermedad que se ha de tratar, si la afección es aguda o crónica, y el tamaño y el estado general del sujeto.

Un anticuerpo anti-CD30L, o una composición farmacéutica que contenga una molécula de este tipo, puede administrarse mediante cualquier método factible. Los agentes terapéuticos proteicos se administrarán normalmente por vía parenteral, por ejemplo mediante inyección, ya que la administración oral, en ausencia de alguna formulación o circunstancia especial, conduciría a la hidrólisis de la proteína en el entorno ácido del estómago. La inyección rápida subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intralesional o peritoneal son posibles vías de administración. Un anticuerpo anti-CD30L también puede administrarse mediante infusión, por ejemplo, intravenosa o subcutánea.

Los anticuerpos anti-CD30L pueden administrarse en forma de una composición que comprenda uno o más componentes adicionales, tales como un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable. Opcionalmente, la composición comprende además uno o más agentes fisiológicamente activos. En diversas realizaciones particulares, la composición comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis agentes fisiológicamente activos además de uno o más anticuerpos anti-CD30L.

Como se usa en el presente documento, una «cantidad eficaz» significa la cantidad de un anticuerpo anti-CD30L de la presente divulgación o composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo que provocará la respuesta biológica o médica o el efecto terapéutico deseado en un tejido, sistema, animal, mamífero o ser humano que busca el investigador, médico u otro clínico. Una cantidad eficaz del anticuerpo puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad eficaz es también aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo es superado por los efectos terapéuticos beneficiosos. Dicho beneficio incluye mejorar los signos o síntomas de la (s) enfermedad(es) inflamatoria (s). Un experto en la materia puede determinar fácilmente una cantidad eficaz mediante el uso de técnicas conocidas y la observación de los resultados obtenidos en circunstancias análogas. Una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD30L de la presente divulgación puede administrarse en una dosis única o en dosis múltiples. En la determinación de la cantidad eficaz para un paciente, el médico responsable considera varios factores, que incluyen, pero sin limitación: el tamaño del paciente (por ejemplo, peso o masa), el área de la superficie corporal, la edad y la salud general; la enfermedad o trastorno específico implicado; el grado de afectación o gravedad de la enfermedad o trastorno; la respuesta del paciente individual; el compuesto particular administrado; el modo de

administración; las características de biodisponibilidad del preparado administrado; el régimen de dosis seleccionado; el uso de medicamentos concomitantes; y otras circunstancias relevantes conocidas por los médicos.

EJEMPLOS

5

Ejemplo 1: Especificidad de CD30L

Para determinar la reactividad cruzada y la especificidad de las especies de anticuerpos, las células HEK 293T cultivadas en medio de expresión Freestyle™ 293 con GlutaMAX (Gibco) suplementado con un 2% de suero bovino fetal (HyClone) y 50 µg/mL de solución salina de disulfato G-418 (Sigma-Aldrich) se transfectaron transitoriamente como se describe a continuación utilizando el reactivo de transfección 293fectin™ (Gibco).

Los miembros de la superfamilia TNF más estrechamente relacionados con CD30L, CD27L, 4-1BBL y FasL se identificaron por homología de secuencia. Las proteínas se expresaron en células HEK 293T mediante transfección utilizando CD30L humano (SEQ ID NO: 40), CD30L de mono cinomolgo (SEQ ID NO: 41), CD27L humano (SEQ ID NO: 15), 4-1BBL humano (SEQ ID NO: 38), FasL humano (SEQ ID NO: 35) o vectores de expresión de control, medio Gibco™ OptiMEM® (Gibco) y reactivo 293Fectin™ (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. También se utilizaron líneas celulares de linfoma humano de células B (Ramos) para determinar la especificidad frente al CD30L expresado endógenamente.

Las células transfectadas se incubaron durante la noche en un agitador orbital a 120 RPM a 37°C, 5% CO₂ en un incubador humidificado. Al día siguiente, se lavaron las células transfectadas y se resuspendieron en tampón FACS (PBS suplementado con un 2% de FBS). Las células se añadieron a placas de poliestireno transparentes con fondo en V de 96 pocillos (Corning®) a 50,000 células por pocillo, y se incubaron con anticuerpos de prueba de 5 µg/mL (o muestras diluidas 2 veces si la concentración era inferior a 5 µg/mL) durante 2 horas a 4°C. Tras lavar dos veces con tampón FACS, las células se tiñeron con Alexa Fluor® 647 conjugado con AffiniPure Goat Anti-Human IgG fragmento Fcγ específico (Jackson ImmunoResearch) y 2.5 µg/mL 7-Aminoactinomicina D (Sigma-Aldrich) durante 20 minutos a 4°C. Tras un lavado adicional, las células se resuspendieron en tampón FACS y se determinó la intensidad de la unión utilizando el instrumento de citometría de flujo iQue con automuestreador Intellicyt (Intellicyt). Los datos adquiridos se analizaron con el software Intellicyt Forecyt® Enterprise Client.

Los datos de los hibridomas derivados de tres cohortes de animales inmunizados se representan en la Tabla 1.

Estos datos demuestran que los anticuerpos se unieron únicamente a CD30L humano y cyno. Ninguno de los anticuerpos analizados en el sobrenadante se unió a CD27L humano, 4-1BBL humano, FasL humano o células 293T transfectadas con un vector de expresión de

control. Un estudio adicional demostró que el anticuerpo purificado 46265 no se une a CD30L murino (SEQ ID NO: 13; relación de 1.0) o CD30L de rata (SEQ ID NO: 14; relación de 1.1).

Tabla 1. Unión de sobrenadantes de hibridoma (concentración final de Ab 5 µg/ml) determinada por citometría de flujo (pliegue de unión sobre el control).

Sobrenadante de hibridoma de anticuerpos	CD30L humano expresado transitoriamente en HEK293T	Cyno CD30L expresado transitoriamente en HEK293T	CD27L humano expresado transitoriamente en HEK293T	4-1BBL humano expresado transitoriamente en HEK293T	FasL humano expresado transitoriamente en HEK293T
46183	228.2	210.7	1.2	0.9	1.0
46265	189.5	193.5	1.3	0.9	1.0

Ejemplo 2: Unión de anticuerpos a PBMC humanas y de mico Cynomolgus

La unión de anticuerpos anti-CD30L a CD30L endógeno expresado por células mononucleares de sangre periférica primarias humanas y de mico cynomolgus (PBMC humanas o cyno) se evaluó mediante citometría de flujo. Para el ensayo de unión de células primarias humanas, se descongelaron células T humanas purificadas (Biological Specialty Corp.) y se suspendieron a una concentración de 2.5×10^6 células/ml. Las células T se estimularon con 5 µg/ml de anti-CD3 humano clon OKT3 (eBioscience) unido a la placa y 1 µg/ml de anti-CD28 humano (BD Pharmingen) en suspensión durante 72 horas a 37 °C/5 % CO₂. Después de 72 horas, las células se retiraron, se lavaron y se suspendieron a una concentración de 0.5×10^6 células/ml con 10 ng/ml de IL-2 (Pepro Tech). Las células se incubaron después durante otros 7 días a 37 °C/5 % de CO₂. Para el ensayo de unión de células primarias de cynomolgus, se descongelaron PBMC de cynomolgus (SNBL) y se suspendieron en una concentración entre 4×10^6 y 5×10^6 células/mL. Las PBMC se estimularon con 1 µg/mL de CD28 antihumano (BD Pharmingen) en suspensión y 1 µg/mL de CD3 antihumano clon SP34 (BD Pharmingen) unido a una placa precubierta con 5 µg/mL de IgG Fc antiratón (Pierce) durante 72 horas a 37 °C/5 % de CO₂. Las células se prepararon para la citometría de flujo después de 72 horas tras la descongelación en el caso de las PBMC de cynomolgus y de 10 días tras la descongelación en el caso de las células T humanas. Tanto las células T humanas como las PBMC de cynomolgus se incubaron primero con sobrenadantes de hibridoma, anticuerpos de control positivo y anticuerpos de control de isotipo. Después de los pasos de lavado, las células se incubaron con el fragmento F(ab')₂ AffiniPure Goat Anti-Human IgG Fc conjugado con Alexa Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch) a 5 µg/mL y 8.25 nM de YoPro1 (Invitrogen). También se incluyó un anti CD4 humano conjugado con el fluoróforo Pacific Blue (BioLegend) para las PBMC de cynomolgus con el fin de detectar la población de células T. A continuación, las células se

pasaron por el citómetro de flujo BD FACSCanto II para detectar la unión del anticuerpo CD30L. Se obtuvieron valores de intensidad de fluorescencia media geométrica (gMFI) para PBMC humanas y cyno marcadas con anticuerpos fluorescentes. Estos valores se dividieron por los obtenidos con PBMC no marcadas para obtener un valor que representara unión de plegamiento respecto al control del isotipo.

Tabla 2. Anticuerpos CD30L uniendo PBMC

Molécula	Unión a PBMC humanas (unión de plegamiento respecto al control)	Unión a Cyno PBMC (unión de plegamiento respecto al control)
46183	16.63	1.83
46265	16.22	1.65

Estos datos demuestran que los sobrenadantes de hibridoma que contienen anticuerpos de la presente divulgación se unen al CD30L humano y de cynomolgus expresado endógenamente en células T primarias.

Ejemplo 3: Afinidad de los anticuerpos anti-CD30L

Los sobrenadantes de hibridoma que contenían el anticuerpo clon 46183 o el anticuerpo clon 46265 se evaluaron mediante un ensayo cinético de exclusión (KinExA) para determinar su afinidad con el CD30L nativo de cynomolgus expresado transitoriamente en células 293T o con el CD30L nativo humano expresado en células Ramos.

Se realizó un KinExA en donde el $K_{apagado}$ se determinó a partir de la concentración de anticuerpo libre que permanece en solución después de que se haya establecido el equilibrio entre el anticuerpo y el antígeno expresado en la superficie celular. KinExA proporciona una determinación más sensible de la afinidad de unión para la forma nativa de CD30L en comparación con el CD30L soluble. El método de Ensayo de Exclusión Cinética se realizó como se describe esencialmente en Rathanaswami et al. Anal. Biochem: 373(1): 52-60 (2008).

Brevemente, se establecieron conjuntos de equilibrio para cada anticuerpo utilizando células Ramos que expresaban CD30L humano o células 293T que expresaban CD30L de mico cynomolgus. Las células se contaron usando un hemocitómetro. Las células Ramos se titularon e incubaron con dos concentraciones constantes diferentes de anticuerpos, una a 48 pM y la otra a 2 nM, en medio HUT (RPMI 1640, 10% FBS, 10 mM HEPES, 2 mM L-Glut, 1 mM Sod. Pyr, 0.1 mM NEAA, 50 µM 2-ME) con 0.05% de azida sódica. Para el conjunto de equilibrio alto [Ab], se valoraron células Ramos de 25 millones por mililitro de concentración 1:2 durante 10 puntos en tubos eppendorf y se equilibraron con 1 nM de anticuerpo en un volumen total de 400 µl. Para el conjunto de equilibrio bajo [Ab], las células Ramos se valoraron a partir de una concentración de 3.89 millones por mililitro, 1:2 durante 10 puntos en tubos Falcon de 50 ml y se equilibraron con 20-30 pM de anticuerpo en un volumen total de 15.5 mL.

Las células 293T que expresaban cyno CD30L se titularon e incubaron con dos concentraciones constantes diferentes de anticuerpos, una a 118 pM y la otra a 5 nM, en medio 293T (medio 293T de expresión Freestyle con 2% de FBS y 50 pg/ml de G418) con 0.05% de azida sódica. Para el conjunto de equilibrio alto [Ab], se titularon células 293T de 25 millones por mililitro de concentración 1:3 durante 10 puntos en tubos eppendorf y se equilibraron con 5 nM de anticuerpo en un volumen total de 200 μ l. Para el conjunto de equilibrio bajo [Ab], se valoraron células 293T de 0.98 millones por mililitro de concentración 1:3 durante 10 puntos en tubos Falcon de 15 ml y se equilibraron con 118 pM de anticuerpo en un volumen total de 10.2 mL. Para cada conjunto de equilibrio, los controles del punto de referencia incluyen una muestra con medio celular solamente y una muestra sin células. Los conjuntos de equilibrio se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente, con agitación. Tras 24 horas de incubación, los sobrenadantes se separaron de los gránulos celulares mediante centrifugación a 500xg durante cinco minutos. Los sobrenadantes de los conjuntos de equilibrio de alto [Ab] y bajo [Ab] se hicieron pasar por una máquina KinExA 3200.

Cada conjunto de muestras de equilibrio se leyó por duplicado en la máquina KinExA. Para las muestras de equilibrio bajo [Ab], se hicieron pasar 6.8 ml y 4.6 ml de cada muestra por duplicado, respectivamente, para los experimentos de equilibrio de CD30L humano y cyno. Para las muestras de alto equilibrio [Ab] se corrieron 16 pL y 75 pL de cada muestra por duplicado, respectivamente para los experimentos de equilibrio CD30L humano y cyno.

Las perlas PMMA (Partículas de Polimetilmetacrilato) se recubrieron con Ab Fc anti-humano de cabra o Ab anti-hlgG (FI+L) de cabra y posteriormente se bloquearon con una solución de bloqueo (1xPBS pF17.4+10mg/mLBSA+0.05% Azida sódica). Para cada muestra de equilibrio, el [Ab] libre se detectó haciendo pasar las muestras de equilibrio a través de las microesferas recubiertas, seguido de un lavado rápido con el tampón de funcionamiento (1xPBS +1% BSA+0.05% Azida sódica). El anticuerpo secundario de detección (anti-hulgG de cabra (FI+L) Alexa 647) se pasó por la célula de flujo a 680 ng/mL y 500 pL por pasada. La señal de salida de tensión del KinExA se utilizó en el software KinExA para calcular la Kd. A partir de los gráficos con dos concentraciones iniciales diferentes de [Ab] total, se obtuvo la Krf mediante el ajuste de curvas utilizando el análisis de curvas n en el software KinExA Pro versión 4.3.11 (Sapidyne Instruments Inc.). El intervalo de confianza del 95% se dio como Kd bajo y Kd alto. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Estos datos demuestran que los anticuerpos de la presente divulgación se unen a CD30L humano y Cyno CD30L con alta afinidad.

Tabla 3. Afinidad de los anticuerpos CD30L a CD30L humano y cyno (se muestran K_d con su respectivo IC del 95 % determinado)

Anticuerpo	CD30L-293T humana		CD30L-293T cyno	
	K _d (pM)	CI al 95 % (pM)	K _d (pM)	CI al 95 % (pM)
46183	34.5	20.0 - 55.6	<30	0.726-28.75
46265	21	11.6-33.7	14.67	4.52-31.28

Ejemplo 4: Actividad funcional mediada por anticuerpos

Se comprobó la capacidad de los anticuerpos para bloquear la estimulación dependiente de la línea celular Ramos (expresión endógena de CD30L) de la línea celular K299 (expresión endógena de CD30) para la producción de interleucina 8 (IL-8). Los Abs se prepararon en el Medio de Ensayo (RPMI1640 con 10% FBS y 2mM L-Glut), comenzando en 80nM con pasos de dilución 1:5, y se cargaron en las placas de 96 pocillos de fondo plano, 50ul/pocillo (20nM concentración final inicial).

Las células Ramos que expresan CD30L se prepararon a 10 millones/ml en el medio de ensayo y se añadieron a los anticuerpos anti-CD30L a 50 µl/pocillo, con lo que se obtuvieron 500,000 células/pocillo. Las células Karpas-299 que expresan CD30 se prepararon a 1 millón/ml en el medio de ensayo y se añadieron a los pocillos que contenían los Abs de prueba y las células Ramos, 100ul/pocillo, resultando 100.000 células/pocillo, proporción Ramos:Karpas-299 5:1.

Las células y los anticuerpos anti-CD30L se incubaron durante la noche a 37°C 5% CO₂. Al final de la incubación se recogieron los sobrenadantes y se midió la secreción inducida de IL8 utilizando kits ELISA de IL8 de R&D. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Estos datos demuestran que los anticuerpos de la presente divulgación inhiben la secreción de IL-8 inducida por CD30L con valores de IC₅₀ en el intervalo picomolar.

Tabla 4. Inhibición de la producción de IL-8 por anticuerpos CD30L

Molécula	Ramos-K299 IC ₅₀ (pM)
46183	38.3
46265	50.3

Ejemplo 5: Los dominios Fc modificados mediante ingeniería YTE muestran una mayor interacción con FcRn

Las soluciones tampón estándar fueron las siguientes 20 mM MES/HCl, 140 mM NaCl, pH = 5.5 (tampón A); 20 mM Tris/HCl, 140 mM NaCl, pH = 8.8 (tampón B). Brevemente, cada analito se diluyó a 0.5 mg/mL en tampón A con una dilución mínima de 5 veces cuando fue posible. La elución en gradiente se realizó tras inyectar 20 µl de analito en una columna preequilibrada en tampón B al 20%. Las condiciones del gradiente fueron del 20 al 100% de tampón B durante 80 minutos tras una carga de 10 minutos, seguida de un lavado al 100% de

B durante 10 minutos antes de un rápido retorno de 3 minutos al 20% de tampón B. Se utilizó un anticuerpo sin YTE (control negativo de YTE) y un anticuerpo con YTE (control positivo de YTE) para normalizar los tiempos de retención (r.t.) de los analitos (r.t. del analito - **r.t. de control negativo de YTE**)/(control positivo de YTE - r.t. de control negativo de YTE). Los datos se ajustaron en OriginPro (OriginLab, Northampton, MA) a una función gaussiana tras la sustracción de la línea de base, y el tiempo de retención del pico resultante y la media anchura máxima completa (FWHM) se obtuvieron a partir de los datos ajustados. Trel indica el tiempo hasta la elución. Un Trel entre cero (control negativo de YTE) y uno (control positivo de YTE) indica una interacción reducida con el FcRn. $t_{rel} = (t_{muestra} - t_{estándar1}) / (t_{estándar2} - t_{estándar1})$. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Anticuerpos anti-CD30L con interacciones YTE con FcRn

Molécula	Tiempo de Ret.	FWHM	Trel	pH de elución
Control negativo de YTE	40	2.1	0	7.44
46183	47.9	2.1	0.35	7.86
46265	48.3	2.1	0.37	7.87
Control positivo de YTE	62.4	5.1	1	8.3

Ejemplo 6: Los dominios Fc modificados mediante ingeniería YTE prolongan la semivida in vivo.

El estudio PK en ratones se realizó en ratones homocigotos macho de la línea 32 transgénica huFcRn. Los anticuerpos anti-CD30L con y sin mutación YTE se formularon en acetato sódico 10 mM con 9% de sacarosa, pH 5.2. Los ratones recibieron una única inyección de 1 mg/kg con el artículo de ensayo adecuado a través de la vena lateral de la cola. Se recogieron muestras de sangre en puntos temporales predeterminados hasta los 42 días mediante venopunción submandibular. Se recogió sangre total, se colocó en tubos separadores de plasma Microvette® de 500 µl, K3 EDTA (20.1341.102, Sarstedt, Newton, NC), se mezcló suavemente mediante 8-10 inversiones manuales y se centrifugó a 11.500 x g a 4 °C durante 5 minutos. El plasma resultante se almacenó a -70°C (±10°C) hasta su análisis.

Las concentraciones de anticuerpo anti-CD30L en muestras de plasma de ratón se determinaron mediante ELISA específico para el artículo de prueba intacto de longitud completa con un mAb anti-IgG humana Fc 1.35.1 de ratón biotinilado (Amgen, PL-50510) como reactivo de captura y ligando CD30 humano recombinante biotinilado/proteína TNFSF8 (R&D Systems, 1028-CL-050) seguido de un conjugado de estreptavidina y peroxidasa de rábano picante (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN) como reactivos de detección. Las concentraciones séricas de

los analitos se interpolaron a partir de una curva estándar utilizando los analitos correspondientes, 46265-2 y 46183-1. El LLOQ para el ensayo en suero fue de 0.61 ng/mL. El ULOQ para el ensayo en suero fue de 10000 ng/mL. Las concentraciones de las muestras se interpolaron a partir de una curva estándar ajustada a un modelo logístico de cuatro parámetros utilizando Watson LIMS (v7.4; Thermo Fisher). Los parámetros PK se estimaron a partir de datos individuales de concentración plasmática-tiempo nominal mediante análisis no compartimental utilizando Phoenix® WinNonlin® (v6.4; Certara, Princeton, NJ). Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Estos datos demuestran que los anticuerpos anti-CD30L diseñados con dominios Fc YTE presentan una semivida prolongada coherente con una ingeniería YTE en el Fc.

Tabla 6. Semivida de los anticuerpos CD30L con o sin YTE

Molécula	AUC (ng*hr/mL)	Aclaramiento (mL/kg/h)	T1/2 (hr)	Relación T1/2 YTE:no YTE
46183	3.31E+06	0.194	746	2.7
46183 sin YTE	2.03E+06	0.459	276	
46265	2.68E+06	0.29	518	1.51
46265 sin YTE	2.70E+06	0.331	344	

Ejemplo 7: Los anticuerpos anti-CD30L disminuyen la respuesta de los anticuerpos a la inmunización

Se inmunizó a ratones Balb/c hembra de ocho semanas de edad mediante inyección intraperitoneal con 100 µg de antígeno de ovoalbúmina 2,4,6-trinitrofeil-haptenada (TNP-ova) precipitado con alumbre (InVivoGen) administrado en 200 µl de PBS. 3 semanas después de la inmunización, los ratones fueron tratados con anti-muCD30L-mulG1 (clon M15) o control de isotipo mulG1, N=5 ratones por grupo. M15 es un anticuerpo CD30L anti-ratón sin función efector de ratón sustituto de los dos anticuerpos descritos en el presente documento, con afinidad y potencia *in vitro* comparables. Un día después del tratamiento, los ratones fueron expuestos a 100 µg de TNP-ova en alumbre. Siete días después de la exposición al antígeno, se realizó eutanasia a los ratones y se recogió suero. También se recogió suero de ratones ingenuos no inmunizados. Los títulos de anticuerpos IgE e IgG se evaluaron mediante ELISA. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Estos datos demuestran que la administración del anticuerpo sustituto murino anti-CD30L redujo tanto las concentraciones de IgE (asociadas a respuestas inflamatorias de tipo 2) como de anticuerpos IgG (asociados a respuestas inflamatorias de tipo 1) en comparación con el control.

Tabla 7. Títulos de IgE e IgG *in vivo*

	IgE en suero (µg/ml)	IgG en suero (µg/ml)
Naïve (sin tratar)	7	2341
Inmunizados + Control de isotipo	85	6892
Inmunizados + Anti-CD30L	42	4370

Ejemplo 8: CD30L en un modelo de inflamación de las vías respiratorias en ratones

Se inmunizó a ratones Balb/c hembra de ocho semanas de edad mediante inyección intraperitoneal con 100 µg de antígeno de ovoalbúmina precipitada con alumbre (InVivoGen). Dos semanas después de la inmunización, los ratones fueron tratados con el anticuerpo CD30L antimurino M15, o con el control de isotipo IgG1, N=5 ratones por grupo. Los ratones fueron tratados dos veces por semana hasta el final del estudio. A partir de un día después del primer tratamiento, se inflamaron las vías respiratorias de los ratones mediante la administración de ovoalbúmina por vía intranasal durante tres días consecutivos cada semana durante tres semanas. Cuatro días después de la última exposición en las vías respiratorias, se realizó la eutanasia a los ratones y se recogieron los tejidos. También se recogieron tejidos de ratones ingenuos no inmunizados como controles. La sangre se recogió en tubos separadores de suero (GE healthcare) y se procesó según las instrucciones del fabricante. El suero se congeló a -20 grados C. El suero se descongeló en momentos posteriores para el análisis mediante ELISA de los títulos de anticuerpos IgE e IgG. Los pulmones se perfundieron con PBS antes de la recogida. Los pulmones perfundidos se procesaron en suspensiones celulares individuales utilizando tubos Miltenyi C y se pasaron por un colador celular de 100 µm. Se contaron las células viables y 1×10^6 células se tiñeron con un panel de anticuerpos para el análisis por citometría de flujo. Tras excluir las células no viables con un reactivo de tinción vivo/muerto, se enumeraron los eosinófilos, los linfocitos B y los linfocitos T utilizando marcadores de linaje estándar. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Estos datos demuestran que, en comparación con el control, la administración del anticuerpo sustituto murino anti-CD30L demostró una reducción de la infiltración pulmonar de eosinófilos (asociada a la inflamación de tipo 2), células B y células T y mostró una reducción de los títulos de anticuerpos para los isotipos IgE e IgG en este modelo de inflamación de las vías respiratorias en ratones.

Tabla 8. Eficacia de un anticuerpo CD30L antimurino *in vivo*

	Eosinófilos pulmonares (10 ⁴)	Células B pulmonares (10 ⁶)	Células T pulmonares (10 ⁶)	IgE en suero (µg/ml)	IgG en suero (mg/ml)
Naïve	0.2	0.9	1.2	6	1.6
Control de isotipo	4.8	2.4	1.9	28	8.1
Anti-CD30L	3.5	1.6	1.4	17	6.1

SECUENCIAS

SEQ ID NO:	Denominación	Secuencia
1.	46183 HCDR1	TYGMH
2.	46183 HCDR2	VISYDASKKHYADAVKG
3.	46183 HCDR3	EEGGGLNYYYGMDV
4.	46183 LCDR1	RASQGIRNNLG
5.	46183 LCDR2	AASSLQS
6.	46183 LCDR3	LQYIDYPFT
7.	46265 HCDR1	TYGIH
8.	46265 HCDR2	VISYDASNKYYADAVKG
9.	46265 HCDR3	DRGAVAGTSYYGMDV
10.	46265 LCDR1	RASQGIRNFLA
11.	46265 LCDR2	AASSLQS
12.	46265 LCDR3	QQYISNPLT
13.	CD30L murino	MEPGLQQAGSCGAPSPDPAMQVQPGSVASPWRSTRPWRS TSRSYFYLTSTALVCLVVAVAILVLVVQKKDSTPNTTEKAPLK GGNCSEDLFCTLKSTPSKKSWAYLQVSKHLNNTKLSWNEDG TIHGLIYQDGNLIVQFPGLYFIVCQLQFLVQCSNHSVDLTQLLI NSKIKKQTLVTVCESGVQSKNIYQNLSQFLLHYLQVNSTISVR VDNFQYVDTNTFPLDNVLSVFLYSSSD
14.	CD30L de rata	MEPGLQQARSRGAPSPDPAMQVPPGSADSLWRSTRPWRT SYFYLTSTIALVCLVVALAILVLVVQKKDSTPKTTESVPLKGGNC SEDLCTLKRTPSKKSWAYLQVSKHLNSAKLSWNQDGTIHL VYQDGNLIVVQFPGWYFICQLQFLVQCSNHSMDLTLQLVINSK IKKQALVTVCESGVQGKNIYHNLSQFLLHYLQVNSTISVRVDN FQYVDTNTFPLDNVLSVFLYSSSD

5

10

15

20

25

30

35

15.	CD27L humana	MPEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFA QAQQQLPLESLGWDVAELQLNHTGPQQDPRLYWQGGPALG RSFLHGPELDKGQLRIHRDGIYMVHIQVTLAICSSTTASRHHPT TLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTN LTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP
16.	ADN que codifica el LC de SEQ ID NO: 30	ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTG CTGCTGTGGCTGAGAGGTGCGCGCTGTGACATCCAGATGA CCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA GTCACCATCACTTGTGCGGGCGAGTCAGGGCATTAGAAATTT TTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAGGCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCC ATCAAGATTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGACTTCACT CTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTA TACTGCCAACAGTATATTAGTAACCCGCTCACTTTCGGCG GAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACGGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA TCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCC CTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGG ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG
17.	ADN que codifica la HC de SEQ ID NO: 29	ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTG CTGCTGTGGCTGAGAGGTGCGCGCTGTGAGGTGCAGCTG GTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCC CTGAGACTCTCCTGTGCGGCCTCTGGATTACCTTCAGCA CCTATGGCATCCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGG GGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATCTCATATGATGCCAGTAA TAAATACTATGCAGACGCCGTGAAGGGCCGATTACCATCT CCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAAC AGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA AAGATCGGGGAGCAGTGGCTGGTACGTCCTACTACGGTAT GGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTGTCTC AGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCC TCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC

5

10

15

20

25

30

35

		TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCT TCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAAC TCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACA CCCTCTATATCACCCGGGAGCCTGAGGTACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA AGCCGTGCGAGGAGCAGTACGGCAGCACGTACCGTTGCG TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAAGCCCTCCCA GCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGGCAGC CCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGA GGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTC AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCCTCC CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGCAAATAG
18.	ADN que codifica el LC de SEQ ID NO: 26	ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTG CTGCTGTGGCTGAGAGGTGCGCGCTGTGACATCCAGATGA CCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTATCGGAGACAGA GTCACCATCGCTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATA ATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGGAATGCCCTAA GCGCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTC CCATCAAGGTTGAGCGGAGTGGATCTGGGACAGAATTCA CTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACT TATTACTGTCTACAGTATATTGATTACCCATTCACTTTCGGC CCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACGGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA TCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCC

5			CTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGG ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG
10	19.	46183 HCVR	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQA PGKGLEWVAVISYDASKKHYADAVKGRFTISRDNSKNTLNQ MNSLRAEDTAVYYCAREEGGGLNYYYGMDVWGQGTTVTVS S
10	20.	46183 LCVR	DIQMTQSPSSLSASIGDRVTIACRASQGIRNNLGWYQQKPGN APKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFAT YYCLQYIDYPFTFGPGTKVDIKR
15	21.	ADN que codifica la HC de SEQ ID NO: 25	ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTG CTGCTGTGGCTGAGAGGTGCGCGCTGTCAGGTGCAGTTG GTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCC CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAC CTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGG GCTGGAGTGGGTGGCAGTTATCTCATATGATGCCAGTAAG AAACACTATGCAGACGCCGTGAAGGGCCGCTTCACCATCT CCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGAATCTGCAAATGAAC AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGA GAGAGGAGGGTGGGGGCCTCAACTACTACTACGGTATGGA CGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTGTCTCAGC CTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCC TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGC CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTG GGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCC CGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGAC CTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCA CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG ACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACC CTCTATATCACCCGGGAGCCTGAGGTACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
20			
25			
30			
35			

5

10

15

20

25

30

35

		CCGTGCGAGGAGCAGTACGGCAGCACGTACCGTTGCGTC AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAAGCCCTCCAGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCT CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGCAAATAG
22.	ADN que codifica la secuencia líder de SEQ ID NO: 27	atggcctgggctctgctgctcctcacctcctcactcagggcacagggctctgggcc
23.	46265 HCVR	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGIHWVRQAP GKGLEWVAVISYDASNKYADAVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKDRGAVAGTSYYGMDVWGQGT TVTVSS
24.	46265 LCVR	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRN FLAWYQQKPGK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQYISNPLTFGGGTKVEIKR
25.	HC de 46183	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQA PGKGLEWVAVISYDASKKHYADAVKGRFTISRDN SKNTLNLQ MNSLRAEDTAVYYCAREEGGLNYYYGMDVWGQGT TVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
26.	LC de 46183	DIQMTQSPSSLSASIGDRVTIACRASQGIRN NLGWYQQKPGN APKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFAT

5			YYCLQYIDYPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC	
	27.	Secuencia líder	MAWALLLTLLTQGTGSWA	
	28.	ADN que codifica la secuencia líder de SEQ ID NO: 32	atggacatgagagtgctgcacagctgctgggcctgctgctgctgctgagaggcg ccagatgc	
10				
15	29.	HC de 46265	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGIHWVRQAP GKGLEWVAVISYDASNKYYADAVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKDRGAVAGTSYYGMDVWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
20				
25				
30	30.	LC de 46265	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNFLAWYQQKPGK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQYISNPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	
35	31.	46183 HC sin lisina C- terminal	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQA PGKGLEWVAVISYDASKKHYADAVKGRFTISRDN SKNTLNLQ MNSLRAEDTAVYYCAREEGGGLNYYYGMDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK	

		ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
5	32.	Secuencia líder
		MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC
10	33.	46265 HC sin lisina C- terminal
15		QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGIHWVRQAP GKGLEWVAVISYDASNKYYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKDRGAVAGTSYYGMDVWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
20	34.	46183 HC pyro-glu
25		pyro- gluVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQ APGKGLEWVAVISYDASKKHYADAVKGRFTISRDNKNTLNL QMNSLRAEDTAVYYCAREEGGGLNYYYGMDVWGQGTTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	35.	FasL humano
35		MQQPFNYPYPQIYWVDSSASSPWAPP GTVLP CPTSVPRRPG QRRPPPPPPPPPLPPPPPPPPPLPPLPLPPLKKRGNHSTGLCLL VMFFMVLVALVGLGLGMFQLFHLQKELAE LRESTSQMHTASS LEKQIGHPSPPPEKKELRKVAHLTGKSNSRSMPL EWEDTYGI VLLSGVKYKKGGLVINETGLYFVYSKVYFRGQSCNNLPLSHK VYMRNSKYPQDLVMMEGKMMSYCTTGQMWARSSYLGA VFN LTSADHLYVNVSEL SLVNFEESQTFFGLYKL

5

10

15

20

25

30

35

36.	46265 HC pyro-glu	pyro- gluVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGIHWVRQA PGKGLEWVAVISYDASNKYYADAVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKDRGAVAGTSYYGMDVWGQGTTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
37.	46183 HC pyro-glu; sin lisina C- terminal	pyro- gluVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQ APGKGLEWVAVISYDASKKHYADAVKGRFTISRDNSKNTLNL QMNSLRAEDTAVYYCAREEGGGLNYYYGMDVWGQGTTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
38.	4-1BBL humana	MEYASDASLDPEAPWPPAPRARACRVLPWALVAGLLLLLLA AACAVFLACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAG LLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLS YKEDTKELVAKAGVYYVFFQLELRRVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAG QRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSP RSE
39.	46265 HC pyro-glu; sin lisina C- terminal	pyro- gluVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGIHWVRQA PGKGLEWVAVISYDASNKYYADAVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKDRGAVAGTSYYGMDVWGQGTTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS

5

10

15

20

25

30

35

		WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWTPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
40.	CD30L humana	MDPGLQQALNGMAPPGDTAMHVPAGSVASHLGTTSRSYFYI TTATLALCLVFTVATIMVLVVQRTDSIPNSPDNVPLKGGNCSE DLLCILKRAPFKKSWAYLQVAKHLNKTCLSWNKDGILHGVRY QDGNLVIQFPGLYFIICQLQLVQCPNNSVDLKELELINKHIKKQ ALVTVCESGMQTKHVYQNLSQFLLDYLQVNTTISVNVDTFQYI DTSTFPLENVLSIFLYSNSD
41.	CD30L cyno	MDPGLQQALNGMAPPGDTTTHVPAGSVASHLETTSRSYFYF TTATLALCLVFTVATIMVLVVQRTDSIPNSPDNIPLRGGNCSED LLCILKRAPFKKSWAYLQVAKHLNKTCLSWNKDGILHGVRYQ DGNLVIQFPGLYFIICQLQLVQCPNNSVDLKELELINKHIKKQA LVTVCESGMQTKHVYQNLSQFLLDYLQVNTTVSVNVDTFQYI DTSTFPLENVLSVFLYSNSD