

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 232**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2010 E 16159238 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3091034**

54 Título: **Anticuerpos anti-CD40 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

10.03.2009 US 159055 P

10.03.2009 US 159059 P

10.03.2009 US 159062 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.02.2021

73 Titular/es:

**BAYLOR RESEARCH INSTITUTE (100.0%)
2001 Bryan St., Suite 2200
Dallas, TX 75201, US**

72 Inventor/es:

BANCHEREAU, JACQUES, F.;
ZURAWSKI, GERARD;
ZURAWSKI, SANDRA y
OH, SANGKON

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 807 232 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-CD40 y usos de los mismos

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere en general al campo de la inmunización, y más particularmente, a nuevos anticuerpos anti-CD40 y vacunas basadas en anticuerpos anti-CD40.

10 **Antecedentes de la técnica**

Sin limitar el alcance de la invención, su antecedente se describe en conexión con presentación de antígenos. Un ejemplo de vacunas y métodos para presentación de antígenos se enseña en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 7.118.751, expedida por Ledbetter, *et al.*, para vacunas de ADN que codifican un antígeno en el extremo amino-terminal unido a un dominio en el extremo carboxi-terminal que se une a CD40. En resumen, se enseña que algunas vacunas que dirigen uno o más antígenos a un receptor de superficie celular para aumentar la respuesta inmunológica humoral y celular específica del antígeno. El antígeno o antígenos unidos a un dominio que se une a un receptor de superficie celular están internalizados, portando antígeno o antígenos en un compartimento intracelular en el que el antígeno o antígenos se digieren en péptidos y se cargan en moléculas de MHC. Los linfocitos T específicos para los antígenos peptídicos se activan, lo que conduce a un aumento de la respuesta inmunológica. La vacuna puede comprender antígeno o antígenos unidos a un dominio que se une al menos a un receptor o un antígeno o antígenos que codifican plásmidos de ADN unidos a un dominio que se une al menos a un receptor. Una realización preferente de la invención dirige el antígeno env del VIH-1 al receptor CD40, dando como resultado el suministro de antígeno a células positivas para CD40, y activación selectiva del receptor de CD40 en células que presentan antígenos de env del VIH-1 a linfocitos T.

Otro ejemplo se encuentra en la solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 20080254026, presentada por Li, *et al.*, para anticuerpos monoclonales anti-CD40 antagonistas y métodos para su uso. En resumen, se desvelan composiciones y métodos para su uso en terapia para tratar enfermedades mediadas por estimulación de la señalización de CD40 en células que expresan CD40. Los métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40 antagonista o fragmento de unión a antígeno del mismo a un paciente con necesidad del mismo. El anticuerpo anti-CD40 antagonista o fragmento de unión a antígeno del mismo está libre de actividad agonista significativa, representa actividad antagonista cuando el anticuerpo se une a un antígeno CD40 en una célula que expresa CD40 humano. La actividad antagonista del anticuerpo anti-CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe de forma beneficiosa la proliferación y/o diferenciación de células que expresan CD40 humano, tales como linfocitos B.

Además, en la solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 20080241139, presentada por Delucia se enseña otro ejemplo para una combinación de adyuvante que comprende un agonista de TLR microbiano, un agonista de CD40 o de 4-1BB, y opcionalmente un antígeno y el uso del mismo para inducir un aumento sinérgico en la inmunidad celular. En resumen, se dice que la presente solicitud enseña combinaciones de adyuvante que comprenden al menos un agonista de TLR microbiano tal como un virus, bacteria o levadura completos o parte de los mismos tal como una membrana, esferoplasto, citotoplasto, o fantasma, un agonista de CD40 o de 4-1BB y opcionalmente un antígeno en el que los 3 restos pueden estar separados o pueden comprender el mismo microorganismo o virus recombinante se desvelan. También se proporciona el uso de estos adyuvantes inmunitarios para el tratamiento de diversas enfermedades crónicas tales como cánceres e infección por VIH.

La solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 20080199471, presentada por Bennett, *et al.*, se refiere a los anticuerpos CD40 optimizados y métodos de uso de los mismos. En resumen, se dice que la presente solicitud enseña anticuerpos que se dirigen a CD40, en la que los anticuerpos comprenden al menos una modificación con respecto a un anticuerpo precursor, en los que la modificación altera la afinidad con respecto a un FcyR o altera la función efectora en comparación con el anticuerpo precursor. También se desvelan métodos para el uso de los anticuerpos de la invención.

Finalmente, la solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 20080181915, presentada por Tripp, *et al.*, se refiere a un adyuvante de ligando de CD40 para virus sincitial respiratorio. En resumen, se dice que la presente solicitud enseña métodos y adyuvantes para aumentar una respuesta inmunológica con respecto al RSV en un hospedador, en la que los métodos y adyuvantes comprenden una fuente de una proteína de unión a CD40. Preferentemente, la proteína de unión a CD40 es CD40L y la fuente es un vector que comprende un promotor unido de forma operativa a una región codificante de CD40L. El aumento de la respuesta inmunológica producida por los adyuvantes y métodos de la presente invención incluyen tanto aumento de la expresión de citoquinas Th1 como aumento de la producción de anticuerpos.

Divulgación de la invención

65 La presente invención proporciona un anticuerpo recombinante o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a CD40, en el que el anticuerpo:

(a) comprende una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 4 o 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3;

5 (b) comprende una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 7 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6; o

(c) es una versión humanizada de (a) o (b).

10 En una realización, la presente invención es un anticuerpo recombinante o un fragmento de unión a antígeno del mismo, ambos de los cuales se unen a CD40, que comprenden: al menos una región variable de cadena ligera de anticuerpo de SEQ ID NO: 4, 5 o 7 y al menos una región variable de cadena pesada de anticuerpo de SEQ ID NO: 3 o 6. En un aspecto, el anticuerpo comprende adicionalmente una región constante de cadena pesada, en el que la región constante de cadena pesada comprende una región constante de cadena pesada humana gamma-1, gamma-2, gamma-3, o gamma-4 o una variante de la región constante de cadena pesada humana. En un aspecto, el anticuerpo comprende adicionalmente una región constante de cadena ligera, en el que la región constante de cadena ligera comprende una región constante de cadena ligera humana lambda o kappa. En otro aspecto, el fragmento de unión se selecciona entre el grupo que consiste en Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂, y un diacuerpo. En otro aspecto, el anticuerpo comprende la secuencia de polipéptidos de las SEQ ID NO: 3 o 6, y/o el anticuerpo comprende la secuencia de polipéptidos de las SEQ ID NO: 4, 5 o 7. En otro aspecto, el anticuerpo se produce por un híbrido anti-CD40_12B4.2C10 (Presentación en Depósito n.º HS446, n.º de Registro en la ATCC ___) o anti-CD40_11B6.1C3 (Presentación en Depósito n.º HS440, n.º de Registro en la ATCC ___). En otro aspecto, el anticuerpo solo es capaz de hacer que las células dendríticas secreten al menos uno de IL-6, MIP-1a, IL-12p40 o TNFalfa sin activación anterior de las células dendríticas. En un aspecto, el anticuerpo es capaz de hacer que las células dendríticas activadas con GM-CSF e Interferón alfa secreten al menos uno de IL-6, MIP-1a, IP-10, IL-10 o IL-12p40. En otro aspecto, el anticuerpo recombinante comprende al menos una identidad de secuencias de un 90 %, 95 %, 99 % o un 100 % con al menos una región variable de cadena ligera de anticuerpo de SEQ ID NO: 4, 5 o 7; y al menos una región variable de cadena pesada de anticuerpo de SEQ ID NO: 3 o 7. En otro aspecto, el anticuerpo está humanizado.

30 Otra realización de la presente invención es una composición que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en la que el anticuerpo es el anticuerpo de la invención.

Otra realización de la presente invención es un anticuerpo recombinante humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de los cuales ambos se unen a CD40, que comprende: a) al menos una región variable de cadena ligera de anticuerpo de SEQ ID NO: 4, 5 o 7; y b) al menos una región variable de cadena pesada de anticuerpo de SEQ ID NO: 3 o 7. En un aspecto, el anticuerpo comprende adicionalmente una región constante de cadena pesada, en el que la región constante de cadena pesada comprende una región constante de cadena pesada humana gamma-1, gamma-2, gamma-3, o gamma-4 o una variante de la región constante de cadena pesada humana. En un aspecto, el anticuerpo comprende adicionalmente una región constante de cadena ligera, en el que la región constante de cadena ligera comprende una región constante de cadena ligera humana lambda o kappa. En otro aspecto, el fragmento de unión se selecciona entre el grupo que consiste en Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂, y un diacuerpo. En otro aspecto, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende la secuencia de polipéptidos de la SEQ ID NO: 3 o 6, y/o la secuencia de polipéptidos de la SEQ ID NO: 4, 5 o 7. En un aspecto, el anticuerpo comprende al menos la región variable de anti-CD40_12B4.2C10 (Presentación en Depósito n.º HS446, n.º de Registro en la ATCC ___) o anti-CD40_11B6.1C3 (Presentación en Depósito n.º HS440, n.º de Registro en la ATCC ___). En otro aspecto, el anticuerpo humanizado comprende las regiones determinantes de la complementariedad de: a) al menos una región variable de cadena ligera de anticuerpo de SEQ ID NO: 4, 5 o 7; y b) al menos una región variable de cadena pesada de anticuerpo de SEQ ID NO: 3 o 7 en un armazón de anticuerpo humano.

50 Otra realización de la presente invención es una composición que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en la que el anticuerpo es un anticuerpo recombinante o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de los cuales ambos se unen a CD40, que comprende: al menos una región variable de cadena ligera de anticuerpo of SEQ ID NO: 4, 5 o 7; y al menos una región variable de cadena pesada de anticuerpo de SEQ ID NO: 3 o 6. En otro aspecto, el anticuerpo comprende al menos la región variable de el anticuerpo anti-CD40_12B4.2C10 (Presentación en Depósito n.º HS446, n.º de Registro en la ATCC ___) o anti-CD40_11B6.1C3 (Presentación en la ATCC n.º HS440, n.º de Registro ___). En otro aspecto, el anticuerpo comprende al menos un dominio variable que tiene una identidad de secuencias de un 90 %, 95 %, 99 % o un 100 % con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3 o 6, y/o SEQ ID NO: 4, 5 o 7. Otra realización de la presente divulgación es un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido de las SEQ ID NOS: 1, 3 o 6, y/o SEQ ID NOS: 2, 4, 5, o 7. En un aspecto de la divulgación, los ácidos nucleicos comprenden adicionalmente secuencias de ácidos nucleicos de anticuerpos humanos que humanizan el anticuerpo. En otro aspecto, el anticuerpo comprende al menos un dominio variable que tiene una identidad de secuencias de un 90 %, 95 %, 99 % o un 100 % con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3 o 6, y SEQ ID NO: 4, 5 o 7. Otra realización de la presente divulgación es un vector de expresión que comprende el ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido de las SEQ ID NOS: 1, 3 o 6, y/o SEQ ID NOS: 2, 4, 5, o 7, unido de forma operativa a secuencias de

control reconocidas por una célula hospedadora transfectada con el vector. En otro aspecto, el anticuerpo comprende al menos un dominio variable que tiene una identidad de secuencias de un 90 %, 95 %, 99 % o un 100 % con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3 o 6, y/o SEQ ID NO: 4, 5 o 7.

5 Otra realización de la presente divulgación es una célula hospedadora que comprende el vector que codifica el ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido de las SEQ ID NOS: 1, 3 o 6, y/o SEQ ID NOS: 2, 4, 5, o 7. En otro aspecto, el anticuerpo comprende al menos un dominio variable que tiene una identidad de secuencias de un 90 %, 95 %, 99 % o un 100 % con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3 o 6, y/o SEQ ID NO: 4, 5 o 7.

10 Otra realización de la presente divulgación es un método para producir un polipéptido, que comprende cultivar la célula hospedadora que comprende ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido de las SEQ ID NOS: 1, 3 o 6, y/o SEQ ID NOS: 2, 4, 5, o 7, en condiciones en las que la secuencia de ácidos nucleicos se expresa, produciendo de ese modo el polipéptido, y recuperar el polipéptido de la célula hospedadora. En otro aspecto, el anticuerpo comprende al menos un dominio variable que tiene una identidad de secuencias de un 90 %, 95 %, 99 % o un 100 % con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3 o 6, y/o SEQ ID NO: 4, 5 o 7.

15 Otra realización de la presente divulgación es un vector de expresión que comprende el ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido de las SEQ ID NOS: 1, 3 o 6, y/o SEQ ID NOS: 2, 4, 5, o 7, unido de forma operativa a secuencias de control reconocidas por una célula hospedadora transfectada con el vector. En otro aspecto, el anticuerpo comprende al menos un dominio variable que tiene una identidad de secuencias de un 90 %, 95 %, 99 % o un 100 % con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3 o 6, y/o SEQ ID NO: 4, 5 o 7.

20 Otra realización de la presente divulgación es un método para producir un polipéptido, que comprende cultivar la célula hospedadora que comprende un vector que comprende ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido de las SEQ ID NOS: 1, 3 o 6, y/o SEQ ID NOS: 2, 4, 5, o 7, en condiciones en las que la secuencia de ácidos nucleicos se expresa, produciendo de ese modo el polipéptido, y recuperar el polipéptido de la célula hospedadora.

25 Otra realización de la presente divulgación es una secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica un anticuerpo específico para CD40 que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 9, 11, 12 o 14 y una cadena pesada que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 8, 10 o 13. En un aspecto, el fragmento de unión es un fragmento de anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂, y un diacuerpo. En otro aspecto, el anticuerpo comprende al menos un dominio variable que tiene una identidad de secuencias de un 90 %, 95 %, 99 % o un 100 % con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3 o 6, y/o SEQ ID NO: 4, 5 o 7.

30 Otra realización de la presente invención es un método para identificar una secuencia de línea germinal aceptora para un anticuerpo humanizado, método que comprende las etapas de: a) identificar un anticuerpo no humano que tiene la actividad biológica deseada seleccionado entre al menos una región variable de cadena ligera de anticuerpo de SEQ ID NO: 2, 4, 5 o 7; y al menos una región variable de cadena pesada de anticuerpo de SEQ ID NO: 1, 3 o 7; b) determinar la secuencia de aminoácidos de dominios VH y VL de un anticuerpo no humano; y c) comparar la secuencia del anticuerpo no humano con un grupo de secuencias de línea germinal humana, en el que la comparación comprende las subetapas de: 1) asignar la secuencia de números de restos de secuencias de dominios VH y VL no humanos; 2) definir las regiones CDR y FR en la secuencia; 3) asignar una puntuación numérica determinada previamente a cada posición del resto para el que las secuencias de línea germinal no humana y humana son idénticas; y 4) sumar todas las puntuaciones de los restos para generar una puntuación total para cada secuencia de línea germinal humana; y d) identificar la secuencia de línea germinal humana con la puntuación del resto total más elevada como la secuencia de línea germinal aceptora. En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo no humano es específico para CD40. En otro aspecto, el anticuerpo comprende al menos un dominio variable que tiene una identidad de secuencias de un 90 %, 95 %, 99 % o un 100 % con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3 o 6, y/o SEQ ID NO: 4, 5 o 7.

35 Otra realización de la presente invención es un anticuerpo generado con el método que comprende a) identificar un anticuerpo no humano que tiene la actividad biológica deseada seleccionado entre al menos una región variable de cadena ligera de anticuerpo de SEQ ID NO: 2, 4, 5 o 7; y al menos una región variable de cadena pesada de anticuerpo de SEQ ID NO: 1, 3 o 7; b) determinar la secuencia de aminoácidos de dominios VH y VL de un anticuerpo no humano; y c) comparar la secuencia del anticuerpo no humano con un grupo de secuencias de línea germinal humana, en el que la comparación comprende las subetapas de: 1) asignar la secuencia de números de restos de secuencias de dominios VH y VL no humanos; 2) definir las regiones CDR y FR en la secuencia; 3) asignar una puntuación numérica determinada previamente a cada posición del resto para el que las secuencias de línea germinal no humana y humana son idénticas; y 4) sumar todas las puntuaciones de los restos para generar una puntuación total para cada secuencia de línea germinal humana; y d) identificar la secuencia de línea germinal humana con la puntuación del resto total más elevada como la secuencia de línea germinal aceptora. En un aspecto, el anticuerpo no humano es específico para CD40. En otro aspecto, el anticuerpo comprende al menos un dominio variable que tiene una identidad de secuencias de un 90 %, 95 %, 99 % o un 100 % con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3 o 6, y SEQ ID NOS: 4, 5 o 7.

60 La presente invención también proporciona un método para preparar un anticuerpo que comprende: expresar en una

célula hospedadora un anticuerpo recombinante o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de los cuales ambos se unen a CD40, en el que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo:

5 (a) comprende una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 4 o 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3;

(b) comprende una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 7 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6; o

10 (c) es una versión humanizada de (a) o (b).

Otra divulgación es un método para preparar un anticuerpo que comprende expresar en una célula hospedadora un anticuerpo recombinante o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de los cuales ambos se unen a CD40, que comprende: al menos una región variable de cadena ligera de anticuerpo de SEQ ID NO: 2, 4, 5 o 7; y al menos una región variable de cadena pesada de anticuerpo de SEQ ID NO: 1, 3 o 7. En un aspecto, la célula hospedadora es una célula bacteriana, fúngica, de insecto, o de mamífero. En otro aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En otro aspecto, el anticuerpo comprende al menos un dominio variable que tiene una identidad de secuencias de un 90 %, 95 %, 99 % o un 100 % con un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3 o 6, y/o SEQ ID NO: 4, 5 o 7.

20 En una realización de la presente invención el que el anticuerpo solo es capaz de hacer que las células dendríticas secreten al menos uno de IL-6, MIP-1a, IL-12p40 o TNFalfa sin activación anterior de las células dendríticas. En un aspecto, el anticuerpo comprende al menos un dominio variable que tiene una identidad de secuencias de un 90 % con al menos una región variable de cadena ligera de anticuerpo de la SEQ ID NO: 4, 5 o 7; y al menos un dominio variable que tiene una identidad de secuencias de un 90 % con una región variable de cadena pesada de anticuerpo de la SEQ ID NO: 3 o 7. En otro aspecto, el anticuerpo comprende la secuencia de polipéptidos de la SEQ ID NO: 3 o 6, la secuencia de polipéptidos de la SEQ ID NO: 4, 5 o 7, o ambas. En otro aspecto, el anticuerpo es producido por un hibridoma seleccionado de anti-CD40_12B4.2C10 (Presentación en Depósito n.º HS446, n.º de Registro en la ATCC___) o anti-CD40_11B6.1C3 (Presentación en la ATCC n.º HS440, n.º de Registro ___). En otro aspecto, el anticuerpo está humanizado. En otro aspecto, el anticuerpo es capaz de hacer que las células dendríticas activadas con GM-CSF e Interferón alfa secreten al menos uno de IL-6, MIP-1a, IP-10, IL-10 o IL-12p40. En otro aspecto, el anticuerpo solo es capaz de causar una proliferación de linfocitos B de al menos un 10 %, 20 %, 25 %, 28 %, 30 % o un 35 %.

35 Otra realización de la presente invención es un anticuerpo recombinante o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención que se une a CD40, en la que el anticuerpo solo es capaz de causar la proliferación de linfocitos B de al menos un 10 % de los linfocitos B. En un aspecto, el porcentaje de linfocitos B que proliferan es al menos un 15 %, 20 %, 25 %, 28 %, 30 % o un 35 %. En un aspecto, el anticuerpo comprende al menos un dominio variable que tiene una identidad de secuencias de un 90 % con al menos una región variable de cadena ligera de anticuerpo de SEQ ID NO: 4, 5 o 7; y al menos un dominio variable que tiene una identidad de secuencias de un 90 % con una región variable de cadena pesada de anticuerpo de SEQ ID NO: 3 o 6. En otro aspecto, el anticuerpo comprende la secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: 3 o 6, la secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: 4, 5 o 7, o ambas. En otro aspecto, el anticuerpo está producido por un hibridoma seleccionado de anti-CD40_12B4.2C10 (Presentación en Depósito n.º HS446, n.º de Registro en la ATCC___) o anti-CD40_11B6.1C3 (Presentación en la ATCC n.º HS440, n.º de Registro ___). En otro aspecto, el anticuerpo está humanizado. En otro aspecto, el anticuerpo solo es capaz de causar que las células dendríticas secreten al menos uno de IL-6, MIP-1a, IL-12p40 o TNFalfa sin activación anterior de las células dendríticas. En otro aspecto, el anticuerpo es capaz de hacer que las células dendríticas activadas con GM-CSF e Interferón alfa secreten al menos uno de IL-6, MIP-1a, IP-10, IL-10 o IL-12p40.

50 Descripción de las Figuras

Para una comprensión más completa de las características y ventajas de la presente invención, ahora se hace referencia a la descripción detallada de la invención junto con las figuras adjuntas y en las que:

55 La Fig. 1 muestra anticuerpos recombinantes de afinidad hacia la proteína A fusionados con diversos péptidos del VIH (calles 1 a 5) secretados a partir de células 293F transfectadas, analizados mediante SDS-PAGE de reducción y tinción con Azul Brillante de Coomassie.

60 La Fig. 2 muestra anticuerpos recombinantes purificados de afinidad hacia la proteína A fusionados con diversos péptidos del VIH (Calles 1 y 2) secretados a partir de células 293F transfectadas, a continuación analizados mediante SDS-PAGE de reducción y tinción con Azul Brillante de Coomassie.

La Fig. 3 muestra anticuerpos recombinantes purificados de afinidad hacia la proteína A fusionados con diversas cadenas de péptidos de VIH (Calles 1 a 5) secretados a partir de células 293F transfectadas, a continuación analizados mediante SDS-PAGE de reducción y tinción con Azul Brillante de Coomassie.

65 La Fig. 4 muestra anticuerpos recombinantes purificados de afinidad hacia la proteína A fusionados con diversas cadenas de péptidos de VIH (Calles 1 a 6) secretados a partir de células 293F transfectadas, a continuación analizados mediante SDS-PAGE de reducción y tinción con Azul Brillante de Coomassie.

La Fig. 5 describe el protocolo usado *in vitro* para someter a ensayo la potencia del anticuerpo recombinante de fusión del péptido del VIH α CD40.LIPO5 (rAb de α CD40.LIPO5) para provocar la expansión de linfocitos T específicos de antígeno en el contexto de un cultivo de PBMC.

La Fig. 6A-C muestra producción de IFN γ específico de péptidos del VIH en PBMC de pacientes con VIH incubadas con diversas concentraciones de vacuna de cadena de péptidos anti-CD40.LIPO5. C es el grupo de control, que no recibió vacuna, y define la respuesta del valor inicial del cultivo a cada péptido.

La Fig. 7 es un resumen de respuestas de la vacuna de péptidos de α CD40.LIPO5 frente a las 5 regiones de péptidos de 8 pacientes con VIH.

La Fig. 8A-C muestra que la vacuna de péptidos del VIH α CD40.LIPO5 provoca expansión de linfocitos T específicos de péptidos del VIH capaces de secretar múltiples citoquinas – una característica deseable en una vacuna. La Fig. 8A-C también muestra que la vacuna de péptidos del VIH α CD40.LIPO5 provoca respuestas específicas de los péptidos gag253, nef66, nef116 y pol325 caracterizadas por producción de múltiples citoquinas (paciente A5).

La Fig. 9 muestra el protocolo para someter al ensayo la vacuna de péptidos del VIH α CD40.LIPO5 por su capacidad para dirigir la expansión de linfocitos T específicos de antígenos que resulta de una captación dirigida por las DC y presentación de epítomos peptídicos en su complejo MHC de superficie.

La Fig. 10A-B muestra la secreción de citoquina como respuesta a péptidos del VIH a partir de cocultivos de células DC-linfocitos T tratados con diversas dosis de vacuna de péptidos del VIH α CD40.LIPO5 (paciente A10).

La Fig. 11A-B muestra las PBMC del paciente A4 tratado con la vacuna de péptidos del VIH α CD40.LIPO5 provocan la expansión de linfocitos T específicos de antígeno con especificidad hacia la región gag253, pero no hacia las secuencias conectoras flexibles.

La Fig. 12A es la secuencia de cadena pesada de la vacuna de péptidos del VIH α CD40.LIPO5 que muestra las regiones conectoras flexibles en letra negrita, las secuencias de unión subrayadas y las regiones de péptidos del VIH sombreadas en color gris. La Fig. 12A muestra que las PBMC del paciente A3 tratado con la vacuna de péptidos del VIH α CD40.LIPO5 provocan la expansión de linfocitos T específicos de antígeno con especificidades hacia las regiones gag253, nef66, y nef116, pero no hacia las secuencias conectoras flexibles. La Fig. 12B-1 y 12B-2 muestra respuestas de linfocitos T específicas de antígeno de VIH provocadas a partir de las PBMC del paciente A17 con VIH incubadas con 30 nM de tres vacunas diferentes de dirección de DC del péptido HIV5. La Fig. 12C-1 y 12C-2 es un estudio similar al que se muestra en la Fig. 12B-1 y 12B-2, excepto en que las PBMC son de un paciente con VIH diferente (A2). La Fig. 12D muestra 15 respuestas de péptidos del VIH diferentes [5 regiones de péptidos de las que se toman muestras en 3 pacientes], se encontró que la vacuna anti-CD40.HIV5pep era superior a la mezcla anti-DCIR.HIV5pep, anti-LOX-1.HIV5pep y no LIPO5 para provocar una amplia gama de respuestas de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ específicos de péptidos del VIH.

La Fig. 13 muestra la internalización de mAb anti-CD40:IL-4DC. Las IL-4DC se trataron con 500 ng/ml de anti-CD40-Alexa 568.

La Fig. 14 muestra proliferación de linfocitos T CD4 y CD8 por las DC dirigidas con anti-CD40-HA1. 5 x 10e3 IFNDC cargadas con 2 ug/ml de anti-CD40-HA o Ig-HA1 de control se cocultivaron con linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ autólogos etiquetados con CFSE (2 x 10e5) durante 7 días. A continuación, las células se sometieron a tinción con anticuerpos anti-CD4 o anti-CD8. La proliferación celular se sometió a ensayo midiendo la dilución de CFSE.

La Fig. 15 muestra una valoración de proteína de fusión de HA1 en la proliferación de linfocitos T CD4⁺. Las IFNDC (5 K) cargadas con proteínas de fusión se cocultivaron con linfocitos T CD4⁺ etiquetados con CFSE (200 K) durante 7 días.

La Fig. 16 muestra las IFNDC dirigidas con linfocitos T CD4⁺ específicos de HA1 activados con anti-CD40-HA1. Los linfocitos T CD4⁺ se volvieron a estimular con las DC cargadas con 5 uM de los péptidos indicados, y a continuación el IFN γ intracelular se sometió a tinción.

La Fig. 17 muestra las IFNDC dirigidas con linfocitos T CD4⁺ específicos de HA1 activados con anti-CD40-HA1. Los linfocitos T CD4⁺ se volvieron a estimular con las DC cargadas con los péptidos indicados durante 36 h, y a continuación el sobrenadante del cultivo se analizó para la medición de IFN γ .

La Fig. 18 muestra que la dirección de CD40 da como resultado la sensibilización cruzada de linfocitos T CD8⁺ específicos de MART-1. Las IFNDC (5 K/pocillo) cargadas con proteínas de fusión se cocultivaron con linfocitos T CD8⁺ purificados durante 10 días. Las células se tiñeron con anti-CD8 y tetrámero. Las células son de donantes sanos (HLA-A*0201+).

La Fig. 19 muestra que la dirección de CD40 da como resultado la sensibilización cruzada de linfocitos T CD8⁺ específicos de MART-1 (Resumen de 8 experimentos repetidos usando células de diferentes donantes sanos).

La Fig. 20 muestra que los CTL CD8⁺ inducidos con las IFNDC dirigidos con anti-CD40-MART-1 son funcionales. Los linfocitos T CD8⁺ cocultivados con las IFNDC dirigidos con proteínas de fusión se mezclaron con células T2 cargadas con epítomo de péptido 10 uM.

La Fig. 21 muestra que los CTL CD8⁺ inducidos con las IFNDC dirigidos con anti-CD40-Flu M1 son funcionales. Los linfocitos T CD8⁺ cocultivados con las IFNDC dirigidos con proteínas de fusión se mezclaron con células T2 cargadas con epítomo de péptido 1,0 nM.

La Fig. 22 muestra un esbozo del protocolo para someter a ensayo la capacidad de una vacuna formada por anti-CD4012E12 unido a PSA (antígeno específico de próstata) para provocar la expansión de una población de linfocitos T sin tratamiento previo. Los linfocitos T CD4⁺ específicos de PSA corresponden a una matriz amplia de epítomos de PSA. En resumen, las DC obtenidas mediante cultivo con IFN α y GM-CSF de monocitos de un donante sano se incuban con la vacuna. Al día siguiente, las células se colocan en medio recién preparado y se añaden linfocitos T CD4⁺ puros del mismo donante. Varios días más tarde, se añaden péptidos de PSA y, después de

cuatro horas, se determinan los niveles de gamma-IFN secretado en los sobrenadantes del cultivo.

La Fig. 23 muestra que muchos péptidos de PSA provocan potentes respuestas de producción de gamma-IFN lo que indica que anti-CD4012E12 y algunos agentes anti-CD40 similares pueden suministrar antígeno a las DC de forma eficaz, dando como resultado la sensibilización de respuestas inmunes frente a múltiples epítomos del antígeno.

La Fig. 24 muestra que las DC dirigidas con anti-CD40-PSA inducen respuestas de linfocitos T CD8⁺ específicas de PSA. Las IFNDC se dirigieron con 1 ug de proteína de fusión de mAb con PSA. Los linfocitos T CD8⁺ autólogos purificados se cocultivaron durante 10 días. Las células se tiñeron con anti-CD8 y tetrámero de PSA (KLQCVDLHV). Las células son de un donante sano positivo para HLA-A*0201. Los resultados demuestran que anti-CD40 suministra PSA a las DC de forma eficaz, que a su vez provocan la expansión de linfocitos T CD8⁺ específicos de PSA.

La Fig. 25 es un esquema (izquierda) y la producción de IFN γ por linfocitos T de las combinaciones de péptidos y control para el Donante 2. Se cocultivaron 5 x 10³ de las IFNDC cargadas con 2 ug/ml de anti-CD40-Ciclina D1 con linfocitos T CD4⁺ autólogos purificados (2 x 10⁵) durante 8 días. A continuación, las células se volvieron a estimular con 5 uM de péptidos individuales obtenidos a partir de Ciclina D1 durante 5 h en presencia de Brefeldina A. Las células se tiñeron para la medición de la expresión de IFN γ intracelular.

La Fig. 26 muestra un barrido de péptidos y producción de IFN γ por linfocitos T obtenidos a partir de las combinaciones de péptidos mostrados en la Fig. 25 y control para el Donante 2. Se cocultivaron 5 x 10³ de las IFNDC cargadas con 2 ug/ml de anti-CD40-Ciclina D1 con linfocitos T CD4⁺ autólogos purificados (2 x 10⁵) durante 8 días. A continuación, las células se volvieron a estimular con 5 uM de péptidos individuales obtenidos a partir de Ciclina D1 durante 5 h en presencia de Brefeldina A. Las células se tiñeron para la medición de la expresión de IFN γ intracelular.

La Fig. 27 muestra la expresión y diseño de la construcción para anticuerpos de péptido anti-CD40-MART-1.

La Fig. 28 es un resumen de los epítomos inmunodominantes de CD4⁺ y CD8⁺ para MART-1.

La Fig. 29 muestra la expresión y diseño de la construcción para anticuerpos de péptido anti-CD40-gp100.

La Fig. 30 muestra el diseño para anticuerpos de péptido anti-CD40-gp100 adicional.

La Fig. 31 muestra la expresión y diseño de la construcción para anticuerpos de péptido anti-CD40-gp100 adicional.

La Fig. 32 es un resumen de los epítomos inmunodominantes de CD4⁺ y CD8⁺ para gp100.

La Fig. 33 muestra la expresión y diseño de la construcción para anticuerpos de péptido anti-CD40-gp100 adicional.

La Fig. 34 muestra los resultados obtenidos con los diversos anticuerpos usando un ensayo que detecta señalización a través de ligación de CD40 - lectura como muerte celular.

La Fig. 35 muestra la unión de diversas construcciones cuando el anticuerpo se ha preparado en una proteína de fusión con doc y a continuación capturas.

Las Figs. 36 y 37 comparan la producción de citoquinas con o sin la adición de GM-CSF e IFN α (Fig. 36 A-D), y anticuerpos solubles solos (Fig. 37A-D) incubados con las DC durante 24 horas.

La Figura 38A-B demuestra el efecto de diversas concentraciones de anticuerpos anti-CD40 de la presente invención en la proliferación de linfocitos B.

Descripción de la invención

Aunque la preparación y uso de diversas realizaciones de la presente invención se discuten con detalle a continuación, se debería observar que la presente invención proporciona muchos conceptos inventivos aplicables que se pueden realizar en una gran diversidad de contextos específicos. Las realizaciones específicas discutidas en el presente documento son simplemente ilustrativas de formas específicas para preparar y usar la invención y no delimitan el alcance de la invención.

Para facilitar la comprensión de la presente invención, a continuación se define una serie de términos. Los términos definidos en el presente documento tienen significados como entiende comúnmente una persona con una experiencia habitual en las áreas relevantes de la presente invención. Algunos términos tales como "un", "una" y "el" no pretenden hacer referencia solamente a una entidad singular, pero incluyen la clase general de la que se puede usar un ejemplo específico para ilustración. En el presente documento la terminología se usa para describir realizaciones específicas de la invención, pero su uso no delimita la invención, excepto como se indica en las reivindicaciones.

La invención también incluye variantes y otra modificación de un anticuerpo (o "Ab") de los fragmentos de los mismos, por ejemplo, proteína de fusión anti-CD40 (anticuerpo se usa de forma indistinta con el término "inmunoglobulina"). Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpos o fragmentos de los mismos", incluye anticuerpos completos o fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fc, y fragmentos de Fv monocatenarios (ScFv), o cualquier fragmento biológicamente eficaz de una inmunoglobulina que se use de forma específica a, por ejemplo, CD40. Los anticuerpos de origen humano o anticuerpos humanizados presentan una reducción o ninguna inmunogenicidad en seres humanos y tienen un número más bajo o ningún epítomo inmunogénico en comparación con los anticuerpos no humanos. Los anticuerpos y sus fragmentos por lo general se seleccionan para que tengan un nivel reducido o ninguna antigenicidad en seres humanos.

Como se usa en el presente documento, los términos "Ag" o "antígeno" se refieren a una sustancia capaz unirse a una región de unión a antígeno de una molécula de inmunoglobulina o de provocar una respuesta inmune, por ejemplo, una respuesta inmunológica mediada por linfocitos T por la presentación del antígeno en proteínas celulares del

Antígeno de Histocompatibilidad Mayor (MHC). Como se usa en el presente documento, "antígeno" incluye, pero no se limita a, determinantes antigénicos, haptenos e inmunógenos que pueden ser péptidos, moléculas pequeñas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos o combinaciones de los mismos. El inmunólogo experto reconocerá que cuando se hace referencia a antígenos que se procesan para su presentación a linfocitos T, el término "antígeno" se refiere a aquellas partes del antígeno (por ejemplo, un fragmento de péptido) que es un epítipo de linfocitos T presentado por MHC al receptor de linfocitos T. Cuando se usa en el contexto de una respuesta inmune mediada por linfocitos B en forma de un anticuerpo que es específico para un "antígeno", la parte del antígeno que se une a las regiones determinantes de la complementariedad de los dominios variables del anticuerpo (ligero y pesado), la parte unida puede ser un epítipo lineal o tridimensional. En el contexto de la presente invención, el término antígeno se usa en ambos contextos, es decir, el anticuerpo es específico para un antígeno de proteína (CD40), pero también porta uno o más epítopos de péptidos para la presentación por MHC a linfocitos T. En ciertos casos, los antígenos administrados por la vacuna o proteína de fusión de la presente invención se internalizan y procesan por las células presentadoras de antígeno antes de presentación, por ejemplo, mediante escisión de una o más partes del anticuerpo o proteína de fusión.

Como se usa en el presente documento, la expresión "péptido antigénico" se refiere a la parte de un antígeno de polipéptido que es reconocido de forma específica por cualquiera de linfocitos B o linfocitos T. Los linfocitos B responden a determinantes antigénicos extraños a través de producción de anticuerpos, mientras que los linfocitos T están mediados por inmunidad celular. Por lo tanto, los péptidos antigénicos son aquellas partes de un antígeno que son reconocidas por anticuerpos, o en el contexto de un MHC, por receptores de linfocitos T.

Como se usa en el presente documento, el término "epítipo" se refiere a cualquier determinante proteico capaz de unirse a una inmunoglobulina o de ser presentado por una proteína del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) (por ejemplo, Clase I o Clase II) a un receptor de linfocitos T. Por lo general, los determinantes epitópicos son péptidos cortos de 5-30 aminoácidos de longitud que se ajustan dentro de la ranura de la molécula del MHC que presenta ciertos grupos laterales de aminoácidos hacia el receptor de linfocitos T y tiene otros ciertos restos en la ranura, por ejemplo, debido a características de carga específicas de la ranura, los grupos laterales del péptido y el receptor de linfocitos T. Por lo general, un anticuerpo se une de forma específica a un antígeno cuando la constante de disociación es 1 mM, 100 nM o incluso 10 nM.

Como se usa en el presente documento, el término "vector" se usa en dos contextos diferentes. Cuando el término "vector" se usa haciendo referencia a una vacuna, un vector se usa para describir una parte no antigénica que se usa para dirigir o entregar la parte antigénica de la vacuna. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmentos del mismo pueden estar unidos a o pueden formar una proteína de fusión con el antígeno que provoca la respuesta inmunológica. Para vacunas celulares, el vector para suministro y/o presentación del antígeno es la célula presentadora de antígeno, que es proporcionada por la célula que se carga con el antígeno. En ciertos casos, el propio vector celular puede también puede procesar y presentar el antígeno o antígenos a los linfocitos T y activar una respuesta inmunológica específica del antígeno. Cuando se usa en el contexto de ácidos nucleicos, un "vector" se refiere a una construcción, que es capaz de entregar, y preferentemente expresar, uno o más genes o secuencias de polinucleótidos de interés en una célula hospedadora. Algunos ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónica, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas y ciertas células eucariotas, tales como células productoras.

Como se usa en el presente documento, los términos "estable" e "inestable" cuando se refieren a proteínas se usan para describir un péptido o proteína que mantiene su estructura y/o actividad tridimensional (estable) o que pierde inmediatamente o con el tiempo su actividad estructura y/o actividad tridimensional (inestable). Como se usa en el presente documento, el término "insoluble" se refiere a aquellas proteínas que cuando se producen en una célula (por ejemplo, una proteína recombinante expresada en una célula eucariota o procariota o *in vitro*) no son solubles en solución sin el uso de condiciones o agentes de desnaturalización (por ejemplo, agentes de desnaturalización por calor o químicos, respectivamente). Se ha encontrado que el anticuerpo o fragmento del mismo y los conectores enseñados en el presente documento convierten proteínas de fusión de anticuerpo con los péptidos de insolubles y/o inestables en proteínas que son estables y/o solubles. Otro ejemplo de estabilidad con respecto a inestabilidad es cuando el dominio de la proteína con una conformación estable tiene una temperatura de fusión más elevada (T_f) que el dominio inestable de la proteína cuando se mide en la misma solución. Un dominio es estable con respecto a otro dominio cuando la diferencia en la T_f es al menos aproximadamente 2 °C, más preferentemente de aproximadamente 4 °C, a un más preferentemente de aproximadamente 7 °C, todavía más preferentemente de aproximadamente 10 °C, incluso más preferentemente de aproximadamente 15 °C, aún más preferentemente de aproximadamente 20 °C, incluso a un más preferentemente de aproximadamente 25 °C, y lo más preferentemente aproximadamente 30 °C, cuando se mide en la misma solución.

Como se usa en el presente documento, "polinucleótido" o "ácido nucleico" se refiere a una hebra de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en cualquiera de una forma de una sola hebra o de doble hebra (incluyendo análogos conocidos de nucleótidos naturales). Una secuencia de ácidos nucleicos de doble cadena incluirá la secuencia complementaria. La secuencia de polinucleótidos puede codificar dominios de región variable y/o constante de inmunoglobulina que se forman en una proteína de fusión con uno o más conectores. Múltiples sitios de clonación

(MCS) se pueden modificar por ingeniería en los lugares en el extremo carboxi-terminal de las cadenas pesadas y/o ligeras de los anticuerpos para permitir una inserción en fase del péptido para expresión entre los conectores. Como se usa en el presente documento, la expresión "polinucleótido aislado" se refiere a se refiere a un polinucleótido de origen genómico, ADNc, o sintético o alguna combinación de los mismos. En virtud de su origen, el "polinucleótido aislado" (1) no se asocia con toda o una parte de un polinucleótido en el que los "polinucleótidos aislados" se encuentran en la naturaleza, (2) se une de forma operativa a un polinucleótido que no está unido en la naturaleza, o (3) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia de mayor tamaño. El experto en la materia reconocerá que para diseño y puesta en marcha, un vector se puede manipular al nivel del ácido nucleico mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica, tales como las que se enseñan en Current Protocols in Molecular Biology, 2007 de John Wiley e Hijos. En resumen, las secuencias de ácidos nucleicos de codificación se pueden insertar usando reacción en cadena de la polimerasa, inserción enzimática de oligonucleótidos o fragmentos de reacción en cadena de la polimerasa en un vector, que puede ser un vector de expresión. Para facilitar la inserción de insertos en el extremo carboxi terminal de la cadena ligera del anticuerpo, la cadena pesada, o ambas, un sitio de clonación múltiple (MCS) se puede modificar por ingeniería en secuencia con las secuencias de anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos y no hace referencia a una longitud específica del producto; por lo tanto, péptidos, oligopéptidos, y proteínas están incluidos dentro de la definición de polipéptido. Este término tampoco hace referencia ni excluye modificaciones después de la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares. Dentro de la definición están incluidos, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), polipéptidos con enlaces sustituidos, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como de origen no natural. El término "dominio" o "dominio del polipéptido" se refiere a la secuencia de un polipéptido que se pliega en una única región globular en su conformación nativa, y que pueden presentar propiedades de unión o funcionales separadas.

Un polipéptido o secuencia de aminoácidos "obtenido a partir de" una secuencia de ácidos nucleicos designada se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la de un polipéptido codificada en la secuencia, o una parte del mismo en el que la parte consiste en al menos 3-5 aminoácidos, preferentemente al menos 4-7 aminoácidos, más preferentemente al menos 8-10 aminoácidos, e incluso más preferentemente al menos 11-15 aminoácidos, o que se puede identificar de forma inmunológica con un polipéptido no codificado en la secuencia. Esta terminología también incluye un polipéptido expresado a partir de una secuencia de ácidos nucleicos designada.

Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier material que cuando se combina con una proteína de fusión de inmunoglobulina (Ig) de la presente invención permite que la Ig retenga actividad biológica y por lo general no es reactivo con el sistema inmunitario del sujeto. Algunos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, vehículos farmacéuticos convencionales tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como las que están en forma de emulsión de aceite/agua, y diversos tipos de agentes humectantes. Ciertos diluyentes se pueden usar con la presente invención, por ejemplo, para administración en aerosol o parenteral, que pueden ser solución salina tamponada con fosfato o solución salina normal (0,85 %).

Un anticuerpo para su uso con la presente invención comprende al menos la región variable de anti-CD40_12B4.2C10 (Presentación en Depósito n.º HS446, n.º de Registro en la ATCC ___) o anti-CD40_11B6.1C3 (n.º de Depósito HS440, n.º de Registro en la ATCC ___).

La divulgación proporciona una molécula de unión a CD40 que comprende al menos un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (VL) que comprende, en regiones hipervariables de secuencias CDR1L, CDR2L y CDR3L, la región CDR1L que tiene la secuencia de aminoácidos SASQGISNYLN (SEQ ID NO: 41), la región CDR2L que tiene la secuencia de aminoácidos YTSILHS (SEQ ID NO: 42) y la región CDR3L que tiene la secuencia de aminoácidos QQFNKLPPT (SEQ ID NO: 43) cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en la SEQ ID NO. 37; y equivalentes directos de las mismas para los anticuerpos anti-CD40_11B6.1C3, o los anticuerpos anti-CD40_12B4.2C10.

Por consiguiente la divulgación proporciona una molécula de unión a CD40 que comprende un sitio de unión a antígeno que comprende al menos un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH) que comprende, en regiones hipervariables de secuencias CDR1H, CDR2H y CDR3H, teniendo la región CDR1H la secuencia de aminoácidos GFTFSDYYMY (SEQ ID NO: 44), teniendo la región CDR2H la secuencia de aminoácidos YINSGGGSTYYPDTVKG (SEQ ID NO: 45), y teniendo la región CDR3H la secuencia de aminoácidos RGLPFHAMDY (SEQ ID NO: 46), cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en la SEQ ID NO. 38; y equivalentes directos de las mismas los anticuerpos anti-CD40_11B6.1C3, o los anticuerpos anti-CD40_12B4.2C10.

En un aspecto la divulgación proporciona una molécula de unión a CD40 de un solo dominio que comprende una cadena ligera de inmunoglobulina aislada que comprende un dominio variable de cadena pesada (VL) como se ha definido anteriormente. En otro aspecto la divulgación proporciona una molécula de unión a CD40 de un solo dominio que comprende una cadena pesada de inmunoglobulina aislada que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) como se ha definido anteriormente.

En otro aspecto la divulgación también proporciona una molécula de unión a CD40 que comprende dominios variables

tanto de cadena pesada (VH) como de cadena ligera (VL) en los que la molécula de unión a CD40 comprende al menos un sitio de unión a antígeno que comprende: a) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VL) que comprende, en regiones hipervariables de secuencias CDR1L, CDR2L y CDR3L, la región CDR1L que tiene la secuencia de aminoácidos SASQGISNYLN (SEQ ID NO: 41), la región CDR2L que tiene la secuencia de aminoácidos YTSILHS (SEQ ID NO: 42), y la región CDR3L que tiene la secuencia de aminoácidos QQFNKLPPT (SEQ ID NO: 43), cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en la SEQ ID. NO. 1, y b) un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (VH) que comprende, en regiones hipervariables de secuencias CDR1H, CDR2H y CDR3H, teniendo la región CDR1H la secuencia de aminoácidos GFTFSDYYMY (SEQ ID NO: 44), teniéndola región CDR2' la secuencia de aminoácidos YINSGGGSTYYPTVKG (SEQ ID NO: 45), y teniendo la región CDR3H la secuencia de aminoácidos RGLPFHAMDY (SEQ ID NO: 46), cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en la SEQ ID NO. 38; y equivalentes directos de las mismas los anticuerpos anti-CD40_11B6.1C3, o los anticuerpos anti-CD40_12B4.2C10.

A menos que se indique de otro modo, en el presente documento se describe cualquier cadena de polipéptidos que tenga una secuencia de aminoácidos que comience en el extremo N-terminal y que termine en el extremo C-terminal. Cuando el sitio de unión a antígeno comprende los dominios tanto VH como VL, éstos se pueden situar en la misma molécula de polipéptido o, preferentemente, cada dominio puede estar en una cadena diferente, siendo el dominio VH parte de una cadena pesada de inmunoglobulina o fragmento de la misma y siendo el dominio VL parte de una cadena ligera de inmunoglobulina o fragmento de la misma.

Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de unión a CD40" se refiere a cualquier molécula capaz de unirse al antígeno CD40 ya sea sola o asociada con otras moléculas que tengan una o más de las CDR de VL y VH enseñadas en el presente documento, en algunos casos 2, 3, 4, 5, o las 6 CDR. La reacción de unión se puede mostrar mediante métodos convencionales (ensayos cualitativos) que incluyen, por ejemplo, un bioensayo para determinar, mediante bloqueo, la unión de otras moléculas a CD40 o cualquier tipo de ensayo de unión o actividad (por ejemplo, activación, reducción o modulación de una respuesta inmunológica), con referencia a un ensayo de control negativo en el que se usa un anticuerpo de especificidad no relacionada pero del mismo isotipo, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD25 o anti-CD80.

La presente divulgación también se puede realizar en una cadena de anticuerpo individual que tenga los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo unidos de forma covalente mediante un conector peptídico que normalmente incluye de 10 a 30 aminoácidos, preferentemente de 15 a 25 aminoácidos. Por lo tanto, una estructura de este tipo no incluye la parte constante de las cadenas pesadas y ligeras y se cree que el espaciador del péptido pequeño debería ser menos antigénico que una parte constante completa.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que las regiones constantes de cadenas pesada o ligera o ambas son de origen humano mientras que los dominios variables de ambas cadenas pesada y ligera no son de origen humano (por ejemplo, ratón, hámster o rata) o de origen humano pero obtenidas a partir de un anticuerpo humano diferente.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo injertado con CDR" se refiere a un anticuerpo en el que las regiones determinantes de la complementariedad hipervariables (CDR) se obtienen a partir de un anticuerpo donante, tal como un anticuerpo no humano (por ejemplo, ratón) o un anticuerpo humano diferente, mientras que todas o sustancialmente todas las otras partes de la inmunoglobulina (por ejemplo, las regiones conservadas de los dominios variables, es decir, regiones marco conservadas), se obtienen a partir de un anticuerpo aceptor (en el caso de un anticuerpo humanizado - un anticuerpo de origen humano). Un anticuerpo injertado con CDR puede incluir unos pocos aminoácidos de la secuencia donante en las regiones marco conservadas, por ejemplo en las partes de las regiones marco conservadas adyacentes a las regiones hipervariables.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo en el que las regiones constantes y variables de las cadenas tanto pesadas como ligeras son todas de origen humano, o sustancialmente idénticas a secuencias de origen humano, no necesariamente del mismo anticuerpo e incluye anticuerpos producidos por ratones en los que los genes de parte variable y constante de inmunoglobulina de ratón, hámster o rata se han reemplazado por sus homólogos humanos, por ejemplo como se describe en términos generales en los documentos EP 0546073 B1, Pat. de Estados Unidos n.º 5.545.806, Pat. de Estados Unidos n.º 5.569.825, Pat. de Estados Unidos n.º 5.625.126, Pat. de Estados Unidos n.º 5.633.425, Pat. de Estados Unidos n.º 5.661.016, Pat. de Estados Unidos n.º 5.770.429, EP 0 438474 B1 y EP 0 463151 B1.

La molécula de unión a CD40 de la invención puede ser un anticuerpo humanizado que comprende las CDR obtenidas a partir de los anticuerpos anti-CD40_11B6.1C3 o el anti-CD40_12B4.2C10. Un ejemplo de un anticuerpo quimérico incluye los dominios variables de las cadenas tanto pesada como ligera que son de origen humano, por ejemplo los dominios variables del anticuerpo anti-CD40_12B4.2C10 en SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5; t/o anti-CD40_11B6.1C3, SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 7, o combinaciones de los mismos. Los dominios de región constante también comprenden preferentemente dominios de región constante humana adecuados, por ejemplo como se describe en "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat E. A. *et al*, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health. Las secuencias de ácidos nucleicos se pueden encontrar,

por ejemplo, en las SEQ ID NOS.: 8 y 9.

Algunas regiones hipervariables se pueden asociar con cualquier tipo de regiones marco conservadas, por ejemplo, de origen humano. Algunas regiones marco conservadas adecuadas fueron descritas por Kabat E. A. Un armazón de cadena pesada es un armazón de cadena pesada, por ejemplo el de un anticuerpo anti-CD40_{12E12.3F3} que forma parte de la SEQ ID NO: 2; anti-CD40_{12B4.2C10} - SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5, y/o anti-CD40_{11B6.1C3} - SEQ ID NO: 7, o combinación de los mismos, por ejemplo, regiones FR1_L, FR2_L, FR3_L y FR4_L. De una manera similar, la SEQ ID NO. 1 muestra el armazón de cadena pesada anti-CD40_{12E12.3F3} (o los equivalentes para anti-CD40_{12B4.2C10} y anti-CD40_{11B6.1C3}, SEQ ID NOS.: 3 y 6, respectivamente) que incluye la secuencia de las oraciones FR1_H, FR2_H, FR3_H y FR4_H. Las CDR se pueden añadir a un armazón de anticuerpo humano, tales como las que se describen en el documento 7.456.260, presentado por Rybak, *et al.*, que enseñan nuevas regiones marco conservadas de cadena variable humanas y anticuerpos humanizados que comprenden las regiones marco. Para conseguir el injerto a un nivel genético, la presente divulgación también incluye las secuencias de ácidos nucleicos subyacentes para las regiones V_L Y V_H así como los anticuerpos completos y las versiones humanizadas de los mismos. Las secuencias de ácidos nucleicos incluyen las SEQ ID NOS.: 8 y 9, que son las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo anti-CD40, respectivamente, así como las secuencias de ácidos nucleicos que incluyen uso de codón variable para las mismas secuencias de aminoácidos y variaciones conservativas de las mismas que tienen una identidad de secuencias de un 85, 90, 95 o un 100 % al nivel del ácido nucleico o del aminoácido. De forma análoga, las CDR pueden tener una identidad de secuencias de un 85, 90, 95 o un 100 % al nivel del ácido nucleico o aminoácido, individualmente, en grupos o 2, 3, 4 o 5 o todas en conjunto.

Algunos anticuerpos monoclonales dirigidos frente a una proteína encontrada de forma natural en todos los seres humanos por lo general se desarrollan en un sistema no humano, por ejemplo en ratones, y como tal son por lo general proteínas no humanas. Como una consecuencia directa de esto, un anticuerpo xenogénico tal como se produce con un hibridoma, cuando se administra a seres humanos, provoca una respuesta inmune indeseable que está mediada predominantemente por la parte constante de la inmunoglobulina xenogénica. Algunos anticuerpos xenogénicos tienden a provocar una respuesta inmunológica en el hospedador, limitando de ese modo el uso de anticuerpos de este tipo ya que no se pueden administrar durante un periodo de tiempo prolongado. Por lo tanto, es particularmente útil usar anticuerpos de una sola cadena, de un solo dominio, quiméricos, injertados con CDR, o especialmente humanos que es probable que provoquen una respuesta alogénica sustancial cuando se administran a seres humanos. La presente invención incluye anticuerpos con cambios menores en una secuencia de aminoácidos tal como delección, adición o sustitución de uno, unos pocos o incluso varios aminoácidos que son simplemente formas alélicas de la proteína original que tiene sustancialmente propiedades idénticas.

La inhibición de la unión de CD40 a su receptor se puede someter a ensayo de forma conveniente en diversos ensayos incluyendo ensayos tales como los que se describen en lo sucesivo en el presente documento en el texto. Con la expresión "hasta el mismo punto" se hace referencia las moléculas de referencia y las equivalentes presentan, en una base estadística, curvas de inhibición de unión a CD40 esencialmente idénticas en uno de los ensayos mencionados anteriormente. Por ejemplo, el ensayo usado puede ser un ensayo de inhibición competitiva de unión a CD40 por las moléculas de unión de la invención.

Por lo general, el anticuerpo anti-CD40 humano de la divulgación comprende al menos: (a) una cadena ligera que comprende un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la mostrada en la SEQ ID NO: 1 comenzando con el aminoácido en la posición 1 y terminando con el aminoácido en la posición 107 y la parte constante de una cadena ligera humana; y (b) una cadena pesada que comprende un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la mostrada en la SEQ ID NO. 2 y la parte constante de una cadena pesada humana. La parte constante de una cadena pesada humana puede ser del tipo $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$, μ , $\beta 2$, δ o ϵ , preferentemente del tipo γ , mientras que la parte constante de una cadena ligera humana puede ser de tipo κ o λ (que incluye los subtipos $\lambda 1$, $\lambda 2$ y $\lambda 3$) pero es preferentemente del tipo κ . En la técnica se conocen bien las secuencias de aminoácidos de las posiciones generales de los dominios variables y constantes y por lo general siguen en la nomenclatura Kabat.

Una molécula de unión a CD40 de la invención se puede producir mediante técnicas de ADN recombinante. A la vista de esto, se deben construir una o más moléculas de ADN que codifican la molécula de unión, colocar en secuencias de control apropiadas y transferir en un organismo hospedador adecuado para expresión.

De una manera muy general, en consecuencia con la divulgación se proporcionan: (i) moléculas de ADN que codifican una molécula de unión a CD40 de un solo dominio de la invención, una molécula de unión a CD40 de una sola cadena, una cadena pesada o ligera o fragmentos de las mismas de una molécula de unión a CD40 de la invención; y (ii) el uso de las moléculas de ADN de la divulgación para la producción de una molécula de unión a CD40 de la invención mediante métodos recombinantes.

El presente estado de la técnica es tal que el trabajador experto en la materia puede sintetizar las moléculas de ADN de la divulgación dada la información proporcionada en el presente documento, es decir, las secuencias de aminoácidos de las regiones hipervariables y las secuencias de ADN que las codifica. Un método para la construcción de un gen de un dominio variable se describe por ejemplo en el documento EPA 239 400. En resumen, se clona un

gen que codifica un dominio variable de un MAb. Los segmentos de ADN que codifican el armazón y regiones hipervariables se determinan y los segmentos de ADN que codifican las regiones hipervariables se retiran de modo que los segmentos de ADN que codifican las regiones marco conservadas se fusionan junto con sitios de restricción adecuados en las uniones. Los sitios de restricción se pueden generar en las posiciones apropiadas mediante mutagénesis de la molécula de ADN mediante procedimientos convencionales. Algunos casetes de CDR sintéticos de doble hebra se preparan mediante síntesis de ADN de acuerdo con las secuencias dadas en la SEQ ID NO: 1 y 3 o 2 y 4 (secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos, respectivamente). Estos casetes a menudo se proporcionan con extremos pegajosos de modo que se pueden ligar en las uniones del armazón.

10 No es necesario tener acceso al ARNm a partir de una línea de células de hibridoma de producción para obtener una construcción de ADN que codifica las moléculas de unión a CD40 de la invención. Por ejemplo, la solicitud de PCT WO 90/07861 da instrucciones completas para la producción de un anticuerpo mediante técnicas de ADN recombinante que solamente dan información con respecto a la secuencia de nucleótidos de un gen. En resumen, el método comprende la síntesis de una serie de oligonucleótidos, su amplificación con el método de PCR, y su corte y empalme para dar la secuencia de ADN deseada.

Algunos vectores de expresión que comprenden un promotor o genes adecuados que codifican partes constantes de cadena pesada y ligera están disponibles al público. Por lo tanto, una vez que se prepara una molécula de ADN de la divulgación, ésta se puede transferir en forma conveniente en un vector de expresión apropiado. Las moléculas de ADN que codifican anticuerpos de una sola cadena también se pueden preparar mediante métodos convencionales, por ejemplo, como se describe en el documento WO 88/1649. A la vista de lo mencionado anteriormente, no es necesario depósito de hibridoma ni de línea celular para cumplir los criterios de suficiencia de descripción.

Por ejemplo, se preparan una primera y segunda construcciones de ADN que se unen de forma específica a CD40. En resumen, una primera construcción de ADN codifica una cadena ligera o fragmento de la misma y comprende a) una primera parte que codifica un dominio variable que comprende regiones marco conservadas e hipervariables de forma alternativa, estando las regiones hipervariables en la secuencia CDR_{1L}, CDR_{2L} y CDR_{3L} cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en la SEQ ID NO: 1; comenzando esta primera parte con un codón que codifica el primer aminoácido del dominio variable y terminando con un codón que codifica el último aminoácido del dominio, y b) una segunda parte que codifica una parte constante de cadena ligera o fragmento de la misma que comienza con un codón que codifica el primer aminoácido de la parte constante de la cadena pesada y termina con un codón que codifica el último aminoácido de la parte constante fragmento de la misma, seguido de un codón de parada.

La primera parte codifica un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7. Una segunda parte codifica la parte constante de una cadena pesada humana, más preferentemente la parte constante de la cadena humana γ 1. Esta segunda parte puede ser un fragmento de ADN de origen genómico (que comprende intrones) o un fragmento de ADNc (sin intrones).

La segunda construcción de ADN codifica una cadena pesada o fragmento de la misma y comprende a) una primera parte que codifica un dominio variable que comprende como alternativa regiones marco conservadas e hipervariables; siendo las regiones hipervariables CDR_{1H} y opcionalmente CDR_{2H} y CDR_{3H}, cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en la SEQ ID NO. 2; comenzando esta primera parte con un codón que codifica el primer aminoácido del dominio variable y terminando con un codón que codifica el último aminoácido del dominio variable, y b) una segunda parte que codifica una parte constante de cadena pesada o fragmento de la misma que comienza con un codón que codifica el primer aminoácido de la parte constante de la cadena ligera y termina con un cordón que codifica el último aminoácido de la parte constante o fragmento de la misma seguido de un codón de parada.

La primera parte codifica un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO. 2. La primera parte tiene la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO. 2 comenzando con el nucleótido en la posición 1 y terminando con el nucleótido en la posición 321. Además, la segunda parte codifica preferentemente la parte constante de una cadena ligera humana, más preferentemente la parte constante de la cadena **k** humana.

La divulgación también incluye moléculas que se unen a CD40 en las que uno o más restos de CDR_{1L}, CDR_{2L}, CDR_{3L}, CDR_{1H}, CDR_{2H} o CDR_{3H} o los armazones, por lo general solamente unos pocos (por ejemplo, FR1-4_L o _H), se cambian a partir de los restos mostrados en las SEQ ID NO. 37 y SEQ ID NO. 38; mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio de las secuencias de ADN correspondientes. La divulgación incluye las secuencias de ADN que codifican tales moléculas de unión a CD40 cambiadas. En particular la divulgación incluye una molécula de unión a CD40 en la que uno, sus restos de CDR_{1L}, CDR_{2L} y/o CDR_{3L} se han cambiado a partir de los restos mostrados en la SEQ ID NO. 37 y uno o más restos de CDR_{1H}, CDR_{2H} y/o CDR_{3H} se han cambiado a partir de los restos mostrados en la SEQ ID NO. 38, o los equivalentes de las SEQ ID NOS.: 1, 3 y 6.

Cada una de las construcciones de ADN se colocan bajo el control de secuencias de control adecuados, en particular bajo el control de un promotor adecuado. Se puede usar cualquier tipo de promotor, con la condición de que se adapte al organismo hospedador en el que las construcciones de ADN se transferirán para expresión. Sin embargo, si la

expresión se va a producir en una célula de mamífero, un promotor de gen de inmunoglobulina se puede usar en linfocitos B cells. La primera y segunda partes se pueden separar por un intrón, y, un potenciador se puede colocar de forma conveniente en el intrón entre la primera y segunda partes. La presencia de un potenciador de este tipo que se transcribe, pero que no se traduce, puede ayudar en la transcripción eficaz. En realizaciones en particular de la divulgación, la primera y segunda construcciones de ADN comprenden el potenciador de, por ejemplo, un gen humano de cadena pesada.

El anticuerpo deseado se puede producir en un cultivo celular o en un animal transgénico. Un animal transgénico adecuado se puede obtener de acuerdo con métodos convencionales que incluyen micro inyección en huevos de la primera y segunda construcciones de ADN colocadas en secuencias de control adecuadas que transfieren los huevos preparados de este modo en hembras pseudopreñadas apropiadas y seleccionando una descendencia que expresa el anticuerpo deseado.

La divulgación también proporciona un vector de expresión capaz de replicarse en una línea de células procariontas o eucariotas, que comprende al menos una de las construcciones de ADN que se han descrito anteriormente. Cada vector de expresión que contiene una construcción de ADN se transfiere a continuación en un organismo hospedador adecuado. Cuando las construcciones de ADN se insertan por separado en dos vectores de expresión, éstas se pueden transferir por separado, es decir un tipo de vector por célula, o se pueden cotransferir, siendo esto último posiblemente preferente. Un organismo hospedador adecuado puede ser una línea celular de bacteria, una levadura o de mamífero, siendo esta última preferente. Más preferentemente, la línea de células de mamífero es de origen linfoide, por ejemplo, un linfocito B de mieloma, hibridoma o un linfocito B inmortalizado normal, que de forma conveniente no expresa ninguna cadena pesada o ligera de anticuerpo endógeno.

Cuando las cadenas de anticuerpo se producen en un cultivo celular, las construcciones de ADN primero se deben insertar en cualquiera de un vector de expresión individual o bien en dos vectores de expresión separados pero compatibles, siendo el último una posibilidad preferente. Para expresión en células de mamífero, es preferente que la secuencia de codificación de la molécula de unión a CD40 se integre en que el ADN de la célula hospedadora dentro de un locus que permita o favorezca un nivel de alta expresión de la molécula de unión a CD40.

En un aspecto más de la divulgación se proporciona un proceso para el producto de una molécula de unión a CD40 que comprende: (i) cultivar un organismo que se transforma con un vector de expresión como se ha definido anteriormente; y (ii) recuperar la molécula de unión a CD40 del cultivo.

De acuerdo con la presente invención, se ha encontrado que el anticuerpo anti-CD40_12E12.3F3, anti-CD40_12B4.2C10 y/o anti-CD40_11B6.1C3 parece que tiene especificidad de unión hacia CD40 humano. Por lo tanto, lo más sorprendente es que los anticuerpos para este epítipo, por ejemplo el anticuerpo anti-CD40_12E12.3F3, anti-CD40_12B4.2C10 y/o anti-CD40_11B6.1C3, son capaces de suministrar antígeno de forma eficaz en células dendríticas (DC). Algunos anticuerpos, en particular anticuerpos quiméricos e injertados con CDR y especialmente anticuerpos humanos, que tienen especificidad de unión para el epítipo antigénico de CD40 humano maduro; y uso de tales anticuerpos para carga de antígeno de DC son nuevos y están incluidos dentro del alcance de la presente divulgación.

Para usar el anticuerpo anti-CD40 de la presente invención para indicaciones de tratamiento, la dosificación apropiada variará, por supuesto, dependiendo, por ejemplo, del anticuerpo desvelado en el presente documento a usar, el hospedador, el modo de administración y la naturaleza y la gravedad de la afección que se está tratando. Sin embargo, en uso profiláctico, por lo general algunos resultados satisfactorios se encuentran a dosificaciones de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 10 mg por kilogramo de peso corporal, más usualmente de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 5 mg por kilogramo de peso corporal. La frecuencia de la dosificación para usos profilácticos normalmente estará en el intervalo de aproximadamente una vez a la semana hasta aproximadamente una vez cada 3 meses, más usualmente en el intervalo de aproximadamente una vez cada 2 semanas hasta aproximadamente una vez cada 10 semanas, por ejemplo, una vez cada 4 a 8 semanas. El anticuerpo anti-CD40 de la presente invención se puede administrar por vía parenteral, por vía intravenosa, por ejemplo, en la vena antecubital u otra vena periférica, por vía intramuscular, o por vía subcutánea. Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden preparar de una manera convencional, por ejemplo, en una forma liofilizada. Para administración inmediata, se disuelve en un vehículo acuoso adecuado, por ejemplo agua estéril para inyección o solución salina fisiológica tamponada estéril. Si se considera deseable preparar una solución de un volumen mayor para administración por infusión en lugar de una inyección en bolo, es ventajoso incorporar albúmina de suero humano o la propia sangre heparinizada del paciente en la solución salina en el momento de la formulación. La presencia de un exceso de tal proteína fisiológicamente inerte previene la pérdida de anticuerpos por adsorción en las paredes del recipiente y tubos usados con la solución de infusión. Si se usa albúmina, una concentración adecuada es de un 0,5 a un 4,5 % en peso de la solución salina.

Una realización de la presente invención proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo humanizado de la invención, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40 humanizado, unido a una o más moléculas efectoras, antígeno(s) y/o una etiqueta o etiquetas detectables. Preferentemente, la molécula efectora es una molécula terapéutica tal como, por ejemplo, uno o más péptidos que comprenden uno o más epítopos de linfocitos T, una toxina,

una molécula pequeña, una citoquina o una quimioquina, una enzima, o una radioetiqueta.

Algunas toxinas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina de difteria. Algunos ejemplos de moléculas pequeñas incluyen, pero no se limitan a, compuestos quimioterapéuticos tales como taxol, doxorubicina, etopósido, y bleiomicina. Algunas citoquinas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, e IL-12, IL-17, e IL-25. Algunas enzimas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, RNAsas, DNAsas, proteasas, quinasas, y caspasas. Algunos radioisótopos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, ³²P e ¹²⁵I.

10 Como se usa en el presente documento, el término "epítipo" se refiere a una molécula o sustancia capaz de estimular una respuesta inmunológica. En un ejemplo, algunos epítipos incluyen, pero no se limitan a, un polipéptido y un ácido nucleico que codifica un polipéptido, en los que la expresión del ácido nucleico en un polipéptido es capaz de estimular una respuesta inmunológica cuando el polipéptido se procesa y se presenta en una molécula de Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). Por lo general, algunos epítipos incluyen péptidos presentados en la superficie de células unidas de forma no covalente a la hendidura de unión del MHC de Clase I o Clase II, de modo que pueden interactuar con receptores de linfocitos T y las respectivas moléculas auxiliares de linfocitos T.

20 Procesamiento Proteolítico de Antígenos. Algunos epítipos que se presentan por MHC en células de presentación de antígenos son péptidos que se pueden escindir o productos de péptidos de mayor tamaño o precursores de antígeno de proteína. Para epítipos de MHC I, algunos antígenos de proteína a menudo se digieren con proteasomas residentes en la célula. La digestión proteasómica intracelular produce fragmentos de péptidos con una longitud de aproximadamente 3 a 23 aminoácidos que a continuación se cargan en la proteína del MHC. Algunas actividades proteolíticas adicionales dentro de la célula, o en el medio extracelular, pueden recortar y procesar estos fragmentos adicionalmente. El procesamiento de epítipos de la Clase II del MHC por lo general se produce a través de proteasas intracelulares del compartimento lisosómico/endosómico. La presente divulgación incluye, en una realización, péptidos procesados previamente que se unen al anticuerpo anti-CD40 (o fragmento del mismo) que dirige los péptidos frente a aquellos de los que se busca un aumento de la respuesta inmunológica directamente a células de presentación de antígeno.

30 Para identificar epítipos potencialmente eficaces como compuestos inmunogénicos, algunas predicciones de la unión del MHC solo son útiles pero a menudo insuficientes. La presente divulgación incluye métodos para identificar de forma específica los epítipos dentro de antígenos que con mayor probabilidad conducirán a la respuesta inmunológica buscada para las fuentes específicas de células de presentación de antígeno y linfocitos T que responden.

35 La presente divulgación permite un ensayo rápido y fácil para la identificación de los epítipos que con la mayor probabilidad van a producir la respuesta inmunológica deseada usando las células de presentación de antígenos del propio paciente y repertorio de linfocitos T. Las composiciones y métodos de la presente divulgación se pueden aplicar a cualquier secuencia de proteínas, permitiendo que el usuario identifique los epítipos que son capaces de unirse a MHC se presentan de forma apropiada a linfocitos T que responderán al antígeno. Por consiguiente, la divulgación no se limita a ninguna diana ni afección médica en particular, sino que en su lugar incluye un epítipo o epítipos de MHC de cualquier fuente útil.

45 Como se usa en el presente documento, el término "revestido" se refiere a un armazón de anticuerpo humanizado en el que los sitios de unión a antígeno o CDR obtenidos a partir de y cuerpos no humanos (por ejemplo, ratón, rata o hámster), se colocan en regiones marco conservadas estructurales de cadena pesada y ligera humanas (FR), por ejemplo, en un polinucleótido de cadena ligera o de cadena pesada para "injertar" la especificidad del anticuerpo no humano en un armazón humano. El vector o vectores de expresión de polinucleótido que expresan los anticuerpos revestidos pueden ser células de mamífero transfectadas para la expresión de anticuerpos humanos recombinantes que presentan la especificidad del antígeno del anticuerpo no humano y se someterán a modificaciones posteriores a la traducción que aumentarán su expresión, estabilidad, su utilidad, o combinaciones de las mismas.

Antígenos.

55 Algunos ejemplos de antígenos virales para su uso con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, VIH, VHC, CMV, adenovirus, retrovirus, picornavirus, etc. Un ejemplo no limitante de antígenos retrovirales como antígenos retrovirales de los antígenos del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) tales como productos genéticos de los genes gag, pol, y env, la proteína Nef, Transcriptasa inversa, y otros componentes del VIH; antígenos virales de la hepatitis tales como las proteínas S, M, y L del virus de la hepatitis B, el antígeno pre-S del virus de la hepatitis B, y otras hepatitis, por ejemplo, hepatitis A, B, y C, componentes virales tales como ARN viral de la hepatitis C; antígenos virales de la gripe tales como hemaglutinina y neuraminidasa y otros componentes virales de la gripe; antígenos virales del sarampión tales como la proteína de fusión del virus del sarampión y otros componentes del virus del sarampión; antígenos virales de la rubéola tales como las proteínas E1 y E2 y otros componentes del virus de la rubéola; antígenos de rotavirus, tales como VP7sc y otros componentes de rotavirus; antígenos de citomegalovirus tales como la glicoproteína B de envoltura y otros componentes de antígeno de citomegalovirus; antígenos del virus sincitial respiratorio tales como la proteína de fusión del RSV, la proteína M2 y otros componentes antigénicos del virus sincitial respiratorio; antígenos virales del herpes simplex, tales como proteínas inmediatas tempranas,

glicoproteína D, y otros componentes antigénicos del virus del herpes simplex; antígenos virales de la varicela zóster, tales como gpl de, gpII, y otros componentes antigénicos virales de la varicela zóster; antígenos virales de la encefalitis japonesa, tales como las proteínas E, M-E, M-E-NS1, NS1, NS1-NS2A, E al 80 %, y otros componentes antigénicos virales de la encefalitis japonesa; antígenos virales de la rabia como glicoproteína de la rabia y otros componentes antigénicos del virus de la rabia. Véase *Fundamental Virology*, Segunda Edición, eds. Fields, B. N. y Knipe, D. M. (Raven Press, New York, 1991) para ejemplos adicionales de antígenos virales. El al menos un antígeno viral pueden ser péptidos a partir de un adenovirus, retrovirus, picornavirus, virus del herpes, rotavirus, hantavirus, coronavirus, togavirus, flavivirus, rhabdovirus, paramixovirus, ortomixovirus, bunyavirus, arenavirus, reovirus, virus del papiloma, parvovirus, virus de la viruela, hepadnavirus, o virus esponjiforme. En ciertos ejemplos específicos, no limitantes, el al menos un antígeno viral son péptidos obtenidos a partir de al menos uno de virus de VIH, CMV, hepatitis A, B, y C, influenza, sarampión, polio, viruela, rubeola; sincitial respiratorio, herpes simplex, varicela zóster, virus de Epstein-Barr, encefalitis japonesa, rabia, gripe, y/o resfriado.

En un aspecto, el uno o más de los péptidos antigénicos se seleccionan entre al menos uno de: Nef (66-97): VGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGL (SEQ ID NO: 148); Nef (116-145): HTQGYPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWLYKL (SEQ ID NO: 149); Gag p17 (17-35): EKIRLRPGGKKKYKLKHIV (SEQ ID NO: 150); Gag p17-p24 (253-284): NPPIPVGEIYKRWILGLNKIVRMYSPTSILD (SEQ ID NO: 151); o Pol 325-355 (RT 158-188) es: AIFQSSMTKILEPFRKQNPDIVIYQYMDDLY (SEQ ID NO: 152). En un aspecto, los péptidos de proteína de fusión se separan con uno o más conectores seleccionados entre: SSVSPTTSVHPTPTSVPPTPTKSSP (SEQ ID NO: 11); PTSTPADSSTITPTATPTATPTIKG (SEQ ID NO: 12); TVTPTATATPSAIVTTITPTATTKP (SEQ ID NO: 13); o TNGSITVAATAPTPTVNTATPSAA (SEQ ID NO: 14).

Algunas dianas antigénicas que se pueden suministrar usando las vacunas de antígeno anti-CD40 de la presente invención incluyen genes que codifican antígenos tales como antígenos virales, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos o antígenos parasitarios. Algunos agentes patógenos incluyen tripanosomas, tenias, lombrices, helmintos, malaria. Algunos marcadores tumorales, tales como antígeno fetal o antígeno específico de próstata, se pueden dirigir de esta manera. Otros ejemplos incluyen: proteínas env del VIH y antígeno de superficie de la hepatitis B. La administración de un vector de acuerdo con la presente divulgación para fines de vacunación podría requerir que los antígenos asociados con vector sean lo suficientemente no inmunogénicos como para permitir la expresión a largo plazo del transgén, para el que se podría desear una respuesta inmunológica intensa. En algunos casos, la vacunación de un individuo solamente puede ser necesaria con poca frecuencia, como cada año o cada dos años, y puede proporcionar protección inmunológica a largo plazo frente al agente infeccioso. Algunos ejemplos específicos de organismos, alérgenos y secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos para su uso en vectores y por último, como antígenos con la presente invención se pueden encontrar en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 6.541.011, en particular, las tablas que emparejan organismos y secuencias específicas que se pueden usar con la presente invención.

Algunos antígenos bacterianos para su uso con las vacunas de antígeno anti-CD40 descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, antígenos bacterianos, tales como toxina de Pertussis, hemaglutinina filamentosa, pertactina, FIM2, FIM3, adenilato de ciclasa y otros componentes antigénicos de bacterias de Pertussis; antígenos bacterianos de difteria, tales como toxina o toxoide de difteria y otros componentes antigénicos de bacterias de difteria; antígenos bacterianos del tétanos tales como toxina o toxoide del tétanos y otros componentes antigénicos de bacterias del tétanos; antígenos bacterianos de estreptococos, tales como proteínas M y otros componentes antigénicos de bacterias estreptocócicas; antígenos bacterianos de bacilos gram-negativos, tales como lipopolisacáridos y otros componentes antigénicos de bacterias gram-negativas, antígenos bacterianos de *Mycobacterium tuberculosis*, tales como ácido micólico, proteína 65 de choque térmico (HSP65), la proteína secretada principal de 30 kDa, antígeno 85A y otros componentes antigénicos de micobacterias; componentes antigénicos de bacterias de *Helicobacter pylori*; antígenos bacterianos neumocócicos como neumolisina, polisacáridos capsulares neumocócicos y otros componentes antigénicos de bacterias neumocócicas; antígenos bacterianos *Haemophilus influenzae* tales como polisacáridos capsulares y otros componentes antigénicos de bacterias de *Haemophilus influenzae*; antígenos bacterianos del ántrax tales como antígeno protector el ántrax y otros componentes antigénicos de bacterias del ántrax; antígenos bacterianos de Rickettsia tales como rompA y otro componente antigénicos de bacterias de Rickettsia. Con los antígenos bacterianos descritos en el presente documento también se incluye cualquier otro antígeno de bacteria, micobacteria, micoplasma, rickettsia, o clamidia. Algunos agentes patógenos parciales o completos también pueden ser: *Haemophilus influenzae*; *Plasmodium falciparum*; *Neisseria meningitidis*; *Streptococcus pneumoniae*; *Neisseria gonorrhoeae*; tífus de serotipo de Salmonella; Shigella; *Vibrio cholerae*; Fiebre del Dengue; Encefalitis; Encefalitis japonesa; enfermedad de Lyme; *Yersinia pestis*; virus del Nilo occidental; fiebre amarilla; tularemia; hepatitis (vímica; bacteriana); RSV (virus sincitial respiratorio); HPIV 1 y HPIV 3; adenovirus; viruela; alergias y cánceres.

Algunos antígenos fúngicos para su uso con las composiciones y métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, componentes antígeno fúngico de Candida; antígenos fúngicos de Histoplasma tales como la proteína 60 de choque térmico (Hsp60) y otros componentes de antígeno fúngico de Histoplasma; antígenos fúngicos criptocócicos tales como polisacáridos capsulares y otros componentes de antígeno fúngico criptocócico; antígenos fúngicos de Coccidioides tales como antígenos esférulares y otros componentes de antígeno fúngico de Coccidioides; y antígenos fúngicos de tiña tales como tricofitina y otros componentes de antígeno fúngico de Coccidioides.

Algunos ejemplos de protozoos y otros antígenos parasitarios incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, antígenos de *Plasmodium falciparum* tales como antígenos de superficie de merozoítos, antígenos de superficie de esporozoítos, antígenos de circunsporozoíto, antígenos de superficie de gametocitos/gametos, antígeno pf 155/RESA de estadio en sangre y otros componentes antigénicos de plasmodios; antígenos de *Toxoplasma* tales como SAG-1, p30 y otros componentes antigénicos de toxoplasma; antígenos de esquistosomas tales como glutatión-S-transferasa, paramiosina, y otros componentes antigénicos de esquistosomas; antígeno principal de *Leishmania* y otros antígenos de *Leishmania* tales como gp63, lipofosfoglicano y su proteína asociada y otros componentes antigénicos de *Leishmania*; antígenos de *Trypanosoma cruzi* tales como el antígeno de 75-77 kDa, el antígeno de 56 kDa y otros componentes antigénicos de tripanosomas.

El antígeno que se puede dirigir usando las vacunas de antígeno anti-CD40 de la presente invención por lo general se seleccionará basándose en una serie de factores, que incluyen: probabilidad de internalización, nivel de especificidad de células inmunológicas, tipo de célula inmunológica dirigida, nivel de maduración y/o activación de célula inmunológica y similares. En esta realización, los anticuerpos pueden ser anticuerpos mono- o biespecíficos que incluyen un dominio de unión anti-CD40 y un dominio de unión frente a un segundo antígeno, por ejemplo, marcadores de superficie celular para células dendríticas tales como, MHC de clase I, MHC de Clase II, B7-2, CD18, CD29, CD31, CD43, CD44, CD45, CD54, CD58, CD83, CD86, CMRF-44, CMRF-56, DCIR y/o Dectina-1 y similares; aunque en algunos casos también con la ausencia de CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD16, CD 19, CD20, CD56, y/o CD57. Algunos ejemplos de marcadores de superficie celular para células presentadoras de antígeno incluyen, pero no se limitan a, MHC de clase I, MHC de clase II, CD45, B7-1, B7-2, receptor de IFN- γ y receptor de IL-2, receptor de ICAM-1 y/o Fc γ . Algunos ejemplos de marcadores de superficie celular para linfocitos T incluyen, pero no se limitan a, CD3, CD4, CD8, CD 14, CD20, CD11b, CD16, CD45 y HLA-DR.

Algunos antígenos diana en superficies celulares para suministro incluyen los característicos de antígenos tumorales que por lo general se obtienen a partir de la superficie celular, citoplasma, núcleo, orgánulos y similares de células de tejido tumoral. Algunos ejemplos de dianas tumorales para la parte de anticuerpo de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, cánceres hematológicos tales como leucemias y linfomas, tumores neurológicos tales como astrocitomas o glioblastomas, melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, tumores gastrointestinales, tales como cáncer gástrico o de colon, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, tumores genitourinarios tales cáncer de cuello uterino, útero, cáncer de ovario, cáncer vaginal, cáncer testicular, cáncer de próstata o cáncer de pene, tumores óseos, tumores vasculares, o cánceres del labio, nasofaringe, faringe y cavidad oral, esófago, recto, vesícula biliar, árbol biliar, laringe, pulmón y bronquios, vejiga, riñón, cerebro y otras partes del sistema nervioso, tiroides, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple y leucemia.

Algunos ejemplos de antígenos que se pueden suministrar solos o en combinación con células inmunológicas para la presentación de antígenos usando la presente invención incluyen proteínas tumorales, por ejemplo, oncogenes mutados; proteínas virales asociadas con tumores; y mucinas y glicolípidos tumorales. Los antígenos pueden ser proteínas virales asociadas con tumores que podrían ser las de las clases de virus indicados anteriormente. Ciertos antígenos pueden ser característicos de algunos tumores (siendo un subconjunto proteínas normalmente no expresadas por una célula precursora tumoral), o pueden ser una proteína que normalmente se expresa en una célula precursora tumoral, pero que tiene una característica de mutación de un tumor. Otros antígenos incluyen variante o variantes mutantes de la proteína normal que tiene una actividad o distribución subcelular alteradas, por ejemplo, mutaciones de genes que dan lugar a antígenos tumorales.

Algunos ejemplos no limitantes específicos de antígenos tumorales para su uso en una vacuna de proteína de fusión anti-CD40 incluyen, por ejemplo, CEA, antígeno específico de próstata (PSA), HER-2/neu, BAGE, GAGE, MAGE 1-4, 6 y 12, MUC (Mucina) (por ejemplo, MUC-1, MUC-2, etc.), gangliósidos GM2 y GD2, ras, myc, tirosinasa, MART (antígeno de melanoma), Pmel 17(gp100), secuencia de GnT-V intrón V (secuencia de N-acetilglucoamiltransferasa V intrón V), Ca psm de Próstata, PRAME (antígeno de melanoma), β -catenina, MUM-1-B (producto genético mutado ubicado de melanoma), 1 de GAGE (antígeno de melanoma), MAGE, 2-10 de BAGE (antígeno de melanoma), c-ERB2 (Her2/neu), DAGE, 1-6 de EBNA (antígeno nuclear del Virus de Epstein-Barr), gp75, E6 y E7 del virus del papiloma humano (HPV), p53, proteína de resistencia pulmonar (LRP), Bcl-2, Ki-67, Ciclina B1, gp100, Survivina, y NYESO-1.

Además, la molécula inmunogénica puede ser un autoantígeno involucrado en el inicio y/o propagación de una enfermedad autoinmunitaria, la patología de la misma se debe en gran parte a la actividad de algunos anticuerpos específicos para una molécula expresada por el órgano, tejido, o células diana pertinente, por ejemplo, SLE o MG. En tales enfermedades, puede ser deseable dirigir una respuesta inmunológica mediada por anticuerpo en curso (es decir, una de tipo Th2) al autoantígeno relevante hacia una respuesta inmunitaria celular (es decir, una de tipo Th1). Como alternativa, puede ser deseable prevenir la aparición de o disminuir el nivel de una respuesta de Th2 al autoantígeno en un sujeto que no tiene, pero de que se sospecha que es susceptible a, la enfermedad autoinmunitaria relevante induciendo de forma profiláctica una respuesta de Th1 al autoantígeno apropiado. Algunos autoantígenos de interés incluyen, pero no se limita: (a) con respecto a SLE, la proteína Smith, ribonucleoproteína RNP, y las proteínas SS-A y SS-B; y (b) con respecto a MG, el receptor de acetilcolina. Algunos ejemplos de otros antígenos diversos implicados en uno o más tipos de respuesta autoinmunitaria incluyen, por ejemplo, hormonas endógenas tales como hormona luteinizante, hormona estimulante folicular, testosterona, hormona de crecimiento, prolactina y

otras hormonas.

En las composiciones y métodos de la invención se pueden usar algunos antígenos involucrados en enfermedades autoinmunitarias, alergia y rechazo a injerto. Por ejemplo, en la presente invención se puede usar un antígeno implicado en una cualquiera o más de las siguientes enfermedades o trastornos autoinmunitarios: diabetes, diabetes mellitus, artritis (incluyendo artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis psoriática), esclerosis múltiple, miastenia gravis, lupus sistémico eritematoso, tiroiditis autoinmune, dermatitis (incluyendo dermatitis atópica y dermatitis eccematosa), psoriasis, síndrome de Sjogren, incluyendo queratoconjuntivitis seca secundaria al Síndrome de Sjogren, alopecia areata, respuestas alérgicas debidas a reacciones de picaduras de artrópodos, enfermedad de Crohn, úlcera aftosa, iritis, conjuntivitis, queratoconjuntivitis, colitis ulcerosa, asma, asma alérgica, lupus eritematoso cutáneo, esclerodermia, vaginitis, proctitis, erupciones por fármacos, reacciones de reversión de la lepra, eritema nodoso leproso, uveítis autoinmunitaria, encefalomiелitis alérgica, encefalopatía hemorrágica necrotizante aguda, pérdida de audición neurosensorial progresiva bilateral idiopática, anemia aplásica, anemia de glóbulos rojos pura, trombocitopenia idiopática, policondritis, granulomatosis de Wegener, hepatitis activa crónica, síndrome de Stevens-Johnson, esprúe idiopático, liquen plano, enfermedad de Crohn, oftalmopatía de Graves, sarcoidosis, cirrosis biliar primaria, uveítis posterior, y fibrosis pulmonar intersticial. Algunos ejemplos de antígenos implicados en las enfermedades auto inmunitarias incluyen ácido glutámico decarboxilasa 65 (GAD 65), ADN nativo, proteína básica de mielina, proteína proteolipídica de mielina, componentes del receptor de acetilcolina, tiroglobulina, y el receptor de la hormona estimulante de tiroides (TSH).

Algunos ejemplos de antígenos implicados en alergia incluyen antígenos de polen, tales como antígenos de polen de cedro japonés, antígenos de polen de ambrosía, antígenos de polen de césped inglés, antígenos obtenidos a partir de animales tales como antígenos de los ácaros del polvo y antígenos de felino, antígenos de histocompatibilidad, y penicilina y otros fármacos terapéuticos. Algunos ejemplos de antígenos implicados en el rechazo a injerto incluyen componentes antigénicos del injerto a trasplantar en el receptor del injerto, tales como corazón, pulmón, hígado, páncreas, riñón, y los componentes de injerto neuronal. El antígeno puede ser un ligando de péptido alterado útil en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria.

Los expertos en la materia observaran que la secuencia de cualquier molécula efectora de proteína ose puede alterar de una manera tal que no influye sustancialmente en las ventajas funcionales de la proteína efectora. Por ejemplo, por lo general se considera que glicina y alanina se pueden intercambiar al igual que el ácido aspártico y el ácido glutámico y la asparagina y la glutamina. Un experto en la materia reconocerá que muchas variaciones diferentes de secuencias efectoras modificarán efectores con aproximadamente la misma actividad que el efector nativo. La molécula efectora y el anticuerpo se pueden conjugar con medios químicos o con medios recombinantes como se ha descrito anteriormente. Algunas modificaciones químicas incluyen, por ejemplo, derivatización para la finalidad de unir la molécula efectora y el anticuerpo entre sí, ya sea directamente o a través de un compuesto de unión, con métodos que se conocen bien en la técnica de química de proteínas. Con los anticuerpos humanizados de la presente invención se pueden usar medios de unión tanto covalentes como no covalentes.

El procedimiento para unir una molécula efectora a un anticuerpo variará de acuerdo con la estructura química del resto a unir al anticuerpo. Por lo general, algunos polipéptidos contienen una diversidad de grupos funcionales; por ejemplo, grupos ácido carboxílico (COOH), amina libre (–NH₂) o sulfhidrilo (–SH), que están disponibles para reacción con un grupo funcional adecuado en un anticuerpo para dar como resultado la unión de la molécula efectora. Como alternativa, el anticuerpo se puede privatizar para exponerse o unirse a grupos funcionales reactivos adicionales, por ejemplo, mediante unión de cualquiera de una serie de moléculas conectoras tales como las disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford Ill.

El conector es capaz de formar enlaces covalentes tanto con el anticuerpo como con molécula efectora. Los expertos en la materia conocen bien algunos conectores adecuados e incluyen, pero no se limitan a, conectores de carbono de cadena lineal o ramificada, conectores de carbono heterocíclicos, o conectores peptídicos. Cuando el anticuerpo y la molécula efectora son polipéptidos, los conectores se pueden unir a los aminoácidos constituyentes a través de sus grupos laterales (por ejemplo, a través de una unión con puente disulfuro a cisteína). Sin embargo, en una realización preferente, los conectores se unirán a los grupos amino y carboxilo del carbono alfa de los aminoácidos terminales.

En algunas circunstancias, es deseable liberar la molécula efectora del anticuerpo cuando el inmunoconjugado ha alcanzado su sitio diana. Por lo tanto, en estas circunstancias, algunos inmunoconjugados comprenderán uniones que se pueden escindir en la proximidad del sitio diana. La escisión del conector para liberar la molécula efectora del anticuerpo se puede provocar mediante actividad o condiciones enzimáticas a las que se somete el inmunoconjugado ya sea dentro de la célula diana o en la proximidad del sitio día. Cuando el sitio diana es un tumor, se puede usar un conector que se pueda escindir en condiciones presentes en el sitio del tumor (por ejemplo, cuando se expone a enzimas asociadas con tumor o pH ácido).

Algunas modificaciones químicas a modo de ejemplo de molécula efectora y el anticuerpo de la presente invención también incluyen derivatización con polietilenglicol (PEG) para prolongar el tiempo de permanencia en el sistema circulatorio y reducir la inmunogenicidad, de acuerdo con métodos bien conocidos (véase por ejemplo, Lisi, *et al.*, Applied Biochem. 4:19 (1982); Beauchamp, *et al.*, Anal Biochem. 131:25 (1982); y Goodson, *et al.*, Bio/Technology 8:

343 (1990)).

La presente divulgación contempla vacunas para su uso en aspectos de inmunización tanto activa como pasiva. Algunas composiciones inmunogénicas, que se proponen como adecuadas para su uso como una vacuna, se pueden preparar de una manera más fácil directamente a partir de péptidos estimulantes de linfocitos T inmunogénicos preparados de una manera desvelada en el presente documento. El material de vacunación se dializa ampliamente para retirar moléculas de peso molecular pequeño no deseadas y/o liofilizar para una formulación más fácil en un vehículo deseado. En cierta realización de la presente invención, las composiciones y métodos de la presente invención se usan para fabricar una vacuna celular, por ejemplo, la parte de unión a anti-CD40 de suministro de antígeno del anticuerpo se usa para dirigir el antígeno o antígenos a una célula de presentación de antígeno, que a continuación "carga" el antígeno en proteínas de MHC para presentación. Por lo tanto, la vacuna celular es la célula de presentación de antígeno que se ha cargado usando las composiciones de la presente invención para generar células de presentación de antígeno cargadas con antígeno.

Cuando la vacuna es la propia proteína de unión anti-CD40, por ejemplo, un anticuerpo completo o fragmentos del mismo, entonces estos " principios activos" se pueden preparar en vacunas usan los métodos comprendidos en la técnica, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos n.^{os} U4.608.251; 4.601.903; 4.599.231; 4.599.230; y 4.578.770. Por lo general, tales vacunas se preparan como agentes inyectables, por ejemplo, como soluciones o suspensiones líquidas o formas sólidas adecuadas para volver a suspender en líquido antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar. El principio inmunogénico activo a menudo se mezcla con excipientes, que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Algunos excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la vacuna puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes de humectación o emulsión, agentes de tamponamiento del pH, o adyuvantes, que aumentan la eficacia de las vacunas.

Las vacunas se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad de modo que sea terapéuticamente eficaz e inmunogénica. La cantidad a administrar depende del sujeto a tratar, incluyendo, por ejemplo, la capacidad del sistema inmunitario del individuo para generar una respuesta inmunitaria. Algunas cantidades precisas de células o principio activo requeridas para su administración dependen del criterio del experto. Sin embargo, algunos intervalos de dosificación adecuados son del orden de unos pocos miles de células (hasta millones de células) para vacunas celulares. Para vacunas convencionales de epítipo o suministro de epítipo, entonces la vacuna puede tener varios cientos de microgramos de principio activo por vacunación. Algunos regímenes adecuados para administración inicial y dosis de refuerzo también son variables, pero se simbolizan con una administración inicial seguido de inoculaciones posteriores u otras administraciones.

El modo de aplicación puede variar ampliamente, sin embargo, con mayor probabilidad ciertas realizaciones en el presente documento se administrarán por vía intravenosa o en el sitio de un tumor o infección directamente. En cualquier caso, se puede aplicar cualquiera de los métodos convencionales para administración de una vacuna. La dosificación de la vacuna dependerá de la vía de administración y variará de acuerdo con el tamaño del hospedador.

En muchos casos, será deseable tener múltiples administraciones de la vacuna, por ejemplo, de cuatro a seis vacunaciones proporcionadas de forma semanal o cada dos semanas. Un régimen de vacunación normal a menudo se producirá en intervalos de dos a doce semanas o en intervalos de tres a seis semanas. Pueden ser deseables refuerzos periódicos a intervalos de 1-5 años, normalmente tres años, para mantener niveles protectores de la respuesta inmunitaria o después de una probabilidad de una remisión o nueva infección. El curso de la inmunización puede ir seguido de ensayos para, por ejemplo, activación de linfocitos T, secreción de citoquinas o incluso producción de anticuerpos, realizada lo más habitualmente *in vitro*. Estos ensayos de respuesta inmunitaria se conocen bien y se pueden encontrar en una gran diversidad de patentes y como se enseña en el presente documento. Una vacuna se puede proporcionar en una o más "dosis unitarias" dependiendo de si se usan los vectores de ácido nucleico, las proteínas purificadas finales, o la forma de vacuna final. Se define que la dosis unitaria contiene una cantidad determinada previamente de la composición terapéutica calculada para producir las respuestas deseadas en asociación con su administración, es decir, la ruta apropiada y el régimen de tratamiento. La cantidad para administrar, y la ruta y formulación en particular, están dentro de la experiencia de los expertos en las técnicas clínicas. El sujeto a tratar también se puede evaluar, en particular, el estado del sistema inmunitario del sujeto y la protección deseada. La administración de una dosis unitaria como una sola inyección no es necesaria pero puede incluir infusión continua durante un periodo de tiempo establecido. La dosis unitaria se puede describir de forma conveniente en términos de ADN/kg (o proteína/Kg) de peso corporal, con intervalos entre aproximadamente 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,5, 1, 10, 50, 100, 1.000 o más mg/ADN o proteína/kg de peso corporal que se administran.

De forma análoga, la cantidad de vacuna de antígeno anti-CD40 suministrada puede variar de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 8,0 mg/kg de peso corporal. Por lo tanto, 0,4 mg, 0,5 mg, 0,8 mg, 1,0 mg, 1,5 mg, 2,0 mg, 2,5 mg, 3,0 mg, 4,0 mg, 5,0 mg, 5,5 mg, 6,0 mg, 6,5 mg, 7,0 mg y 7,5 mg de la vacuna se pueden suministrar a un individuo *in vivo*. La dosificación de la vacuna a administrar depende una gran medida del peso y la condición física del sujeto que se está tratando así como de la vía de administración y la frecuencia del tratamiento. Una composición farmacéutica que incluye un polinucleótido desnudo unido previamente a un vector de suministro liposomal o viral se puede administrar en cantidades que varían de 1 µg a 1 mg de polinucleótido con respecto a de 1 µg a 100 mg de

proteína. Por lo tanto, algunas composiciones en particular pueden incluir entre aproximadamente 1 µg, 5 µg, 10 µg, 20 µg, 30 µg, 40 µg, 50 µg, 60 µg, 70 µg, 80 µg, 100 µg, 150 µg, 200 µg, 250 µg, 500 µg, 600 µg, 700 µg, 800 µg, 900 µg o 1.000 µg de polinucleótido o proteína que se une de forma independiente a 1 µg, 5 µg, 10 µg, 20 µg, 30 µg, 40 µg, 50 µg, 60 µg, 70 µg, 80 µg, 100 µg, 150 µg, 200 µg, 250 µg, 500 µg, 600 µg, 700 µg, 800 µg, 900 µg, 1 mg, 1.5 mg, 5 mg, 10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg o 100 mg de vector.

Algunos anticuerpos de la presente invención se pueden unir opcionalmente preforma covalente o no covalente a una etiqueta detectable. Algunas etiquetas detectables para un uso de este tipo incluyen cualquier composición detectable con métodos espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Algunas etiquetas útiles en la presente invención incluyen perlas magnéticas (por ejemplo, DYNABEADS), colorantes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina, proteína fluorescente de color verde, y similares), radioetiquetas (por ejemplo, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, o ³²P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras usadas comúnmente en un ELISA), y etiquetas colorimétricas tales como oro coloidal o perlas de vidrio o plástico coloreadas (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

Los expertos con experiencia en la materia conocen bien algunos métodos para detectar tales etiquetas. Por lo tanto, por ejemplo, algunas radioetiquetas se pueden detectar usando película fotográfica o contadores de centelleo, algunos marcadores fluorescentes se pueden detectar usando un fotodetector para detectar iluminación emitida. Algunas etiquetas enzimáticas por lo general se detectan proporcionando la enzima con un sustrato y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima en el sustrato, y algunas etiquetas colorimétricas se detectan simplemente visualizando la etiqueta coloreada.

Las composiciones de anticuerpo y/o inmunoconjugado de la presente invención son particularmente útiles para administración parenteral, tal como administración intravenosa o administración en una cavidad corporal. Las composiciones para administración normalmente comprenderán una solución del anticuerpo y/o inmunoconjugado disuelto en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferentemente un vehículo acuoso. Se puede usar una diversidad de vehículos acuosos, por ejemplo, solución salina tamponada y similares. Estas soluciones son estériles y por lo general libres de material no deseado. Estas composiciones se pueden esterilizar con técnicas de esterilización bien conocidas, convencionales. Estas composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables si fuera necesario para aproximar las condiciones fisiológicas tales como ajuste del pH y agentes de tamponamiento, agentes para ajuste de la toxicidad y similares, por ejemplo, acetato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, lactato sódico y similares. La concentración de proteína de fusión en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se seleccionará principalmente basándose en volúmenes de fluido, viscosidad es, peso corporal y similares de acuerdo con el modo de administración en particular seleccionado y las necesidades del paciente.

Por lo tanto, una composición de inmunoconjugado farmacéutico habitual para administración intravenosa sería de aproximadamente 0,1 a 10 mg por paciente al día. Se pueden usar dosificaciones de 0,1 hasta aproximadamente 100 mg por paciente al día. Algunos métodos reales para preparar composiciones que se pueden administrar serán conocidos o evidentes para los expertos en la materia y se describen con más detalle en publicaciones tales como REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE, 19^a ED., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1995).

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar para tratamientos terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que padece una enfermedad, en una cándida suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Algunas cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad que el estado general de la salud del paciente. Una cantidad eficaz del compuesto es la que proporciona un alivio subjetivo de un síntoma(s) o una mejora que se puede identificar de forma objetiva tal como lo indica el médico u otro observador cualificado.

Las administraciones individuales o múltiples de las composiciones se administran dependiendo de la dosificación y la frecuencia si fuera necesario y son toleradas por el paciente. En cualquier caso, la composición debería proporcionar una cándida suficiente de las proteínas de la presente invención para tratar de forma eficaz al paciente. Preferentemente, la dosificación se administra una vez pero se puede aplicar de forma periódica hasta que se consigue un resultado terapéutico o hasta que los efectos secundarios garantizan la interrupción de la terapia. Por lo general, la dosis es suficiente para tratar mejorar síntomas o signos de enfermedad sin producir toxicidad inaceptable al paciente.

Algunas formulaciones parenterales de liberación controlada de las composiciones de inmunoconjugado se pueden preparar como implantes, inyecciones oleosas, o como sistemas de partículas. Para una amplia visión de conjunto de sistemas de suministro de proteínas véase, Banga, A. J., THERAPEUTIC PEPTIDES AND PROTEINS: FORMULATION, PROCESSING, AND DELIVERY SYSTEMS, Technomic Publishing Company, Inc. Lancaster, Pa., (1995). Algunos sistemas de partículas incluyen microesferas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas, y nanopartículas. Algunas microcápsulas contienen la proteína terapéutica como un núcleo central. En las microesferas, el agente terapéutico se dispersa a través de la partícula. Las partículas, microesferas, y microcápsulas con un tamaño inferior a aproximadamente 1 µm por lo general se denominan nanopartículas,

nanoesferas, y nanocápsulas, respectivamente. Algunos capilares tienen un diámetro de aproximadamente 5 µm de modo que solamente las nanopartículas se administran por vía intravenosa. Algunas micropartículas por lo general tienen un diámetro de aproximadamente 100 µm y se administran por vía subcutánea o por vía intramuscular.

5 Se pueden usar polímeros para liberación controlada por ión de composiciones de inmunocombinado. En la técnica se conocen diversas matrices poliméricas degradables y no degradables para su uso en administración farmacológica controlada (Langer, R., Accounts Chem. Res. 26: 537-542 (1993)). Por ejemplo, el copolímero en bloque, poloxamer 407® existe como un líquido viscoso aunque móvil a bajas temperaturas pero forma un gel semisólido a temperatura corporal, la hidroxiapatita, que se ha usado como un microvehículo para liberación controlada de proteínas y/o liposomas, se puede usar para liberación controlada así como para dirección del fármaco del fármaco en forma de cápsulas lipídicas. Se conocen numerosos sistemas adicionales para administración controlada de proteínas terapéuticas. Véanse, por ejemplo, los documentos de Pat. de Estados Unidos n.ºs 5.055.303, 5.188.837, 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028 4.957.735 y 5.019.369, 5.055.303; 5.514.670; 5.413.797; 5.268.164; 5.004.697; 4.902.505; 5.506.206, 5.271.961; 5.254.342 y 5.534.496.

15 Entre los diversos usos de los anticuerpos de la invención se incluyen una diversidad de patologías causadas por células humanas específicas. Por ejemplo, para una versión humanizada del anticuerpo anti-CD40_12E12.3F3 de ratón (n.º de Registro en la ATCC PTA-9854), anti-CD40_12B4.2C10 (n.º de Depósito HS446, n.º de Registro en la ATCC _), and anti-CD40_11B6.1C3 (n.º de Depósito HS440, n.º de Registro en la ATCC _), anticuerpos desvelados en el presente documento, una aplicación para anticuerpos es el tratamiento, puesta en contacto, formación de imágenes, activación o desactivación de células que expresan CD40.

25 Esta divulgación proporciona kits para el suministro de antígenos, por ejemplo, CD40 o un fragmento inmunorreactivo del mismo, conjugados o en forma de una proteína de fusión con uno o más epítopos de linfocitos T o linfocitos B. Una "muestra biológica", como se usa en el presente documento, es una muestra de tejido o fluido biológico que contiene el antígeno. Las muestras de este tipo incluyen, pero no se limitan a, tejido de biopsia, sangre, y células sanguíneas (por ejemplo, glóbulos blancos). Preferentemente, las células son linfocitos, por ejemplo, células dendríticas. Las muestras biológicas también incluyen secciones de tejidos, tales como secciones congeladas tomadas para fines histológicos. Una muestra biológica por lo general se obtiene de un organismo eucariota pluricelular, preferentemente un mamífero tal como rata, ratón, vaca, perro, cobaya, o conejo, y más preferentemente un primate, tal como un macaco, chimpancé, o ser humano. Más preferentemente, la muestra es de un ser humano. Los anticuerpos de la invención también se pueden usar *in vivo*, por ejemplo, como una herramienta de diagnóstico para formación de imágenes *in vivo*. Algunos kits por lo general comprenderán una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un anticuerpo de la presente invención (o fragmento del mismo) con una o más partes de armazón o múltiples sitios de clonación en el extremo carboxi-terminal en el que se pueden insertar las secuencias de codificación para uno o más antígenos. En algunas divulgaciones, el anticuerpo será un fragmento de Fv anti-CD40 humanizado, tal como un fragmento de scFv o dsFv. Además los kits por lo general incluirán materiales con instrucciones que desvelan métodos para uso de un anticuerpo de la presente invención (por ejemplo, para su carga en células dendríticas antes de inmunización con las células dendríticas, que pueden ser células dendríticas autólogas). Los kits también pueden incluir componentes adicionales para facilitar la aplicación en particular para la que se diseña el kit. Por lo tanto, por ejemplo, el kit además puede contener métodos para detectar la etiqueta (por ejemplo, sustratos enzimáticos para etiquetas enzimáticas, conjuntos de filtros para detectar etiquetas fluorescentes, etiquetas secundarias apropiadas tales como HRP anti-ratón de oveja, o similares). Los kits pueden incluir adicionalmente tampones u otros reactivos usados de forma rutinaria para la práctica de un método en particular. Los kits de este tipo y contenidos apropiados son bien conocidos por los expertos en la materia.

50 En otro conjunto de usos para la invención, los anticuerpos dirigidos por anticuerpos de la invención se pueden usar para eliminar células dirigidas a partir de una población de células en cultivo. Por ejemplo, si una población específica de linfocitos T es preferente, los anticuerpos de la presente invención se pueden usar para enriquecer una población de linfocitos T que tenga el efecto o puesto de la respuesta inmune en curso. Por lo tanto, por ejemplo, las células cultivadas a partir de un paciente con un cáncer se pueden eliminar de células cancerosas proporcionando al paciente células dendríticas que se cargaron con antígeno usando los anticuerpos de la invención como un resto de dirección para los antígenos que desencadenarán una respuesta inmune frente al cáncer, virus u otro agente patógeno. De forma análoga, los anticuerpos se pueden usar para aumentar la población de linfocitos T reguladores o dirigir la respuesta inmune hacia o alejarla de una respuesta de linfocitos T citotóxicos o incluso dirigir una respuesta de linfocitos B.

anti-CD40_12E12.3F3

60 anti-CD40_12E12.3F3_H-V-hlgG4H-C - **la región subrayada muestra la secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena Pesada:**

MNLGLSLIFLVLVLKGVQCEVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSDYMYWVRQTPEKRLE
WVAYINSGGGSTYYPDTVKGRFTISRDNANTLYLQMSRLKSEDTAMYCARRGLPFHAMDYWG
QGTSTVTVSSAKTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFEGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNKKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNYHTQKLSLS
LGKAS (SEQ ID NO.: 1)

anti-CD40_12E12.3F3_K-V-hlgGK-C - la región subrayada muestra la secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena Ligera

5

MMSSAQFLGLLLLCFQGTRCDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASOGISNYLNWYQQKPDGTVKLL
IYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTIGNLEPEDIATYYCQQFNKLPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC- (SEQ ID NO.: 2)

anti-CD40_12B4.2C10

10

Cadena Pesada de anti-CD40_12B4.2C10:

MEWSWIFLFLLSGTAGVHSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYVLHWVKQKPGQGLE
WIGYINPYNDGTYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGYPAYSGYAMDYW
GQGTSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVL
QKGEFV (SEQ ID No.: 3)

Cadena Ligera de anti-CD40_12B4.2C10:

15

MMSSAQFLGLLLLCFQGTRCDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLL
IYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCHHGNTLPWTFGGGKLEIKRADAAPT
SIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLT
KDEYERHNSYTCEATHKSTSTSPIVKSFNRENC (SEQ ID No.: 4)

Cadena Ligera de **anti-CD40_12B4.2C10** - clon alternativo (17K6)

MDFQVQIFSFLLISASVIMSRGQIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYRYQQKPGSSPKPWI
YGTSNLAGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQYHSYPLTFGAGTKLELKRADAAPT
SIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLT
KDEYERHNSYTCEATHKSTSTSPIVKSFNRENC (SEQ ID No.: 5)

20

anti-CD40_11B6.1C3

Cadena Pesada de anti-CD40_11B6.1C3:

25

MGWSWIFLFLLSGTAGVLSEVQLQQSGPELVKPGASVKISKASGYSFTGYMHVVKQSHVKSLE
WIGRINPYNGATSYNQNFKDKASLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVYYCAREDYVYWGQGTTLT
VSSAKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQKGEFV
(SEQ ID No.: 6)

Cadena Ligera de anti-CD40_11B6.1C3:

MKLPVRLLVLMFWIPASSSDVVMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQ
SPKLLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGS GTFDFALKISRVEAEDLVYFCSQSTHVPWTFGGGKLEIKRAD
AAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSS
TLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK (SEQ ID No.: 7)

[anti-CD40_12E12.3F3_H-V-hlgG4H-C] - la región subrayada muestra la secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena Pesada:

5

ATGAACTTGGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCTTGTGTTTAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGAA
GCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAACC
TCTGGATTCACTTTCAGTGACTATTACATGTATTGGGTTCCGACACTCCAGAGAAGAGGCTGG
AGTGGGTGCGATACATTAATTCTGGTGGTGGTAGCACCTATTATCCAGACACTGTAAAGGGCCG
ATCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCCGGCTGAAGTCT
GAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGACGGGGGTTACCGTTCCATGCTATGGACTATTGGG
GTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGAAGGGCCATCCGTCTCCCCCTGGC
GCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC
CCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCG
CTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG
GGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA
GTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCCTGCCAGCACCTGAGTTCGAAGGGGGACCAT
CAGTCTTCTGTTCCCCCAAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTAC
GTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGG
CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGT
GGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT
CTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
AGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCCT
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA
GCCGGAGAACAATAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTAC
AGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAAGCTAGCT
GA (SEQ ID NO.: 8)

[anti-CD40_12E12.3F3_K-V-hlgGK-C] - la región subrayada muestra la secuencia de la región V de la cadena Ligera

10

ATGATGTCCTCTGCTCAGTTCCTTGGTCTCCTGTTGCTCTGTTTTCAAGGTACCAGATGTGATAT
CCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTAGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGC
AGTGCAAGTCAGGGCATTAGCAATTATTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTA
AACTCCTGATCTATTACACATCAATTTTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGG
GTCTGGGACAGATTATTCTCTCACCATCGGCAACCTGGAACCTGAAGATATTGCCACTTACTATT
GTCAGCAGTTTAAATAAGCTTCTCCGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAACTCGAGATCAAAACGAAC
TGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCT
CTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAA
CGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTA
CAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTATGCCTG
CGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTA
G (SEQ ID NO.: 9)

Cadena pesada de anti-CD40_12B4.2C10_H-V-hlgG4H-C

ATGGAATGGAGTTGGATATTTCTTTCTTCTGTGTCAGGAACTGCAGGTGTCCACTCTGAGGTCCA
GCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCT

15

TCTGGATACACATTCACTGACTATGTTTTGCACTGGGTGAAACAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTG
AGTGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGATGGTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAA
GGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCT
GAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGGGGCTATCCGGCCTACTCTGGGTATGCTATGGACT
ACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGAAGGGCCCATCCGCTTCCC
CCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC
TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCT
TCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGC
AGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC
AAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCCTGCCAGCACCTGAGTTCGAAGGGG
GACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA
GGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGT
GGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTC AACAGCACGTA
CCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAG
CCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTC
AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT
GGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCC
TCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGTCCG
TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAGC
TAGCTGA (SEQ ID NO.: 10)

Cadena Ligera de anti-CD40_12B4.2C10_K-V-hlgGK-C (variante 1)

ATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAATGTCCAGGG
GACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCAT
GACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTACAGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTC
ACCCAAACCCTGGATTTATGGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGTT CAGTGGC
AGTGGATCTGGGACCTCTTATTCTCTACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTT
ATTA CTGCCAGCAATATCATAGTTACCCGCTCAGTCTCGGTGCTGGGACCAAGCTCGAGATCAA
ACGAACCTGTGGTGCACCATCTGTCTTCACTTCTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA
ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGG
TGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA
GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCT
ATGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAG
AGTGTTAG (SEQ ID NO.: 11)

5

Cadena Ligera de anti-CD40_12B4.2C10_K-V-hlgGK-C (Variante 2)

ATGATGTCCTCTGCTCAGTTCCTTGGTCTCCTGTTGCTCTGTTTTCAAGGTACCAGATGTGATAT
CCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTACCCATCAGTTGC
AGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTT
AAACTCCTGATCTACTACACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTT CAGTGGCAGTG
GGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTT
TTGCCATCATGGTAATACGCTTCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCCAACCAAGCTCGAGATCAAACGA
ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGC
CTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGAT
AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC
TACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTATGCC

TGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
TAG (SEQ ID NO.: 12)

10

Cadena pesada de anti-CD40_11B6.1C3_H-V-hlgG4H-C

ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTTTCTCCTGTCAGGAACTGCAGGTGTCCTCTCTGAGGTCCA
 GCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCT
 TCTGGTTACTCATTCACTGGCTACTACATGCACTGGGTGAAGCAAAGCCATGTAAAGAGCCTTG
 AGTGGATTGGACGTATTAATCCTTACAATGGTGTACTAGCTACAACCAGAATTTCAAGGACAA
 GGCCAGCTTGACTGTAGATAAGTCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCACAGCCTGACATCT
 GAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGAGGACTACGTCTACTGGGGCCAAGGCACCACTC
 TCACAGTCTCCTCAGCCAAAACGAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAG
 CACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACG
 GTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTC
 CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTA
 CACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATA
 TGGTCCCCCATGCCACCCTGCCAGCACCTGAGTTCGAAGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTC
 CCCCCAAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGG
 ACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATA
 ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCTCA
 CCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGGCC
 TCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGT
 ACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCA
 AAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA
 ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGT
 GGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA
 CAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAAGCTAGCTGA (SEQ ID NO.: 14)

Cadena Ligera de anti-CD40_11B6.1C3_K-V-hlgGK-C

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGTGCTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCAGCAGTGATGTTGT
 GATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGAT
 CTAGTCAGAGCCTTGACACAGTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGG
 CCAGTCTCCAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCAGACAGGTTT
 AGTGGCAGTGGATCAGGACAGATTTTCGCACTCAAGATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATCTG
 GGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTCG
 AGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA
 ATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAG
 TGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC
 AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC
 AAAGTCTATGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACA
 GGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO:15)

5

Ejemplo 1: Anti-CD40 - vacuna de péptidos del VIH

10 Se seleccionaron cinco secuencias con una longitud de 19 a 32 aminoácidos a partir de una multiplicidad de epítomos de linfocitos T citotóxicos (CTL) identificados en las proteínas HIV-1 Nef, Gag y Env en el contexto de diferentes moléculas de la clase I de MHC. Se ha informado que algunas respuestas de CTL se pueden inducir de forma eficaz mediante vacunas lipopeptídicas en ratones, en primates, y en seres humanos. Los cinco péptidos del VIH se modificaron a continuación en posición C-terminal mediante un grupo (Palm)-NH₂ y las cinco secuencias peptídicas del VIH se han descrito bien en la bibliografía científica [por ejemplo, Characterization of a multi-lipo-peptides mixture used as an HIV-1 vaccine candidate (1999) Klingner *et al.*, Vaccine, Volumen 18, 259-267] y en una solicitud de patentes [Cytotoxic T lymphocyte-inducing lipopeptides and use as vaccines. Gras-Masse H. *et al.*, documento de Patente n.º EP0491628 (1992-06-24); documento US 5871746 (16-02-1999)].

15

20 Una vacuna para el VIH muy deseable debería estar formada por anticuerpo receptor de células anti-dendríticas recombinante fusionado con los péptidos del VIH mencionados anteriormente. La presente divulgación incluye composiciones y métodos para producir de forma eficaz proteínas y vacunas para el VIH.

20

Las secuencias que se muestran a continuación son las secuencias de aminoácidos de los cinco péptidos del VIH seleccionados y las posiciones de los aminoácidos dentro de cada proteína del VIH están entre paréntesis.

25

Nef (66-97) es: VGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGG (SEQ ID NO: 16)
 Nef (116-145) es: HTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWLYKL (SEQ ID NO: 17)
 Gag p17 (17-35) es: EKIRLRPGGKKKYKLVK (SEQ ID NO: 18)

Gag p17-p24 (253-284) es: NPPIPVGIEYKRWIILGLNKIVRMYSPSILD (SEQ ID NO: 19)
 Pol 325-355 (RT 158-188) es: AIFQSSMTKILEPFRKQNPDIVIYQYMDDL (SEQ ID NO: 20).

Se describen en el presente documento composiciones y métodos para ensamblar construcciones que codifican péptidos del VIH y secuencias conectoras Flexibles. Los vectores de expresión de cadena Pesada por lo general tienen un sitio Nhe I [g|ctagc] adjunto al codón del resto C-terminal de la cadena Pesada, o [para vectores flex- v1] al codón C-terminal de la secuencia flex-v1. Las secuencias conectoras flexibles o secuencias de péptidos del VIH tienen un sitio Spe I [a|ctagt] que precede al conector flexible N-terminal o al codón del péptido del VIH, un sitio Nhe I adjunto al conector flexible C-terminal o codón del péptido del VIH, seguido de un codón de parada de TGA, seguido de un sitio Eco RI, seguido de un sitio Not I. Tales fragmentos de conector flexible o péptido del VIH Spe I - Not I se insertan en el vector de la cadena Pesada preparará con la digestión de Nhe I - Not I. Nhe I y Spe I son sitios compatibles, pero cuando se ligan [g|ctagt] ya nunca más en su sitio Nhe I o Spe I. Por lo tanto, algunos fragmentos adicionales de conector flexible Spe I - Not I o de péptido del VIH se pueden insertar en el nuevo intervalo de Nhe I - Not I distal al conector flexible o péptido del VIH inicial. De este modo, las cadenas del péptido del VIH y/o regiones codificantes del conector flexible se pueden adjuntar a la región que codifica la cadena Pesada del vector de expresión.

La Fig. 1 muestra anticuerpos recombinantes de afinidad hacia la proteína A fusionados con diversos péptidos del VIH (calles 1 a 5) secretados a partir de células 293F transfectadas, analizados mediante SDS-PAGE de reducción y tinción con Azul Brillante de Coomassie. La Fig. 2 muestra anticuerpos recombinantes purificados de afinidad hacia la proteína A fusionados con diversos péptidos del VIH (Lanes 1 y 2) secretados a partir de células 293F transfectadas, a continuación analizados mediante SDS-PAGE de reducción y tinción con Azul Brillante de Coomassie. La Fig. 3 muestra anticuerpos recombinantes purificados de afinidad hacia la proteína A fusionados con diversas cadenas de péptidos de VIH (Calles 1 a 5) secretados a partir de células 293F transfectadas, a continuación analizados mediante SDS-PAGE de reducción y tinción con Azul Brillante de Coomassie. La Fig. 4 muestra anticuerpos recombinantes purificados de afinidad hacia la proteína A fusionados con diversas cadenas de péptidos de VIH (Calles 1 a 6) secretados a partir de células 293F transfectadas, a continuación analizados mediante SDS-PAGE de reducción y tinción con Azul Brillante de Coomassie.

Ejemplo 2. Vacuna de péptidos del VIH – biología de dirección de antígeno *in vitro*

Ensayos de vacuna de péptidos del VIH anti-CD40.LIPO5 en pacientes con VIH *in vitro*. Para estudiar la capacidad del anticuerpo recombinante de fusión del péptido del VIH α CD40.LIPO5 (rAb de α CD40.LIPO5) para mediar la presentación del antígeno, el rAb de fusión se añadió a células sanguíneas de individuos infectados por VIH y se midió la producción de citoquinas a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

La Fig. 5 describe el protocolo usado *in vitro* para someter a ensayo la potencia del anticuerpo recombinante de fusión del péptido del VIH α CD40.LIPO5 (rAb de α CD40.LIPO5) para provocar la expansión de linfocitos T específicos de antígeno en el contexto de un cultivo de PBMC. En resumen, las PBMC (2×10^6 células/ml) de aféresis de pacientes con VIH se incuban con un intervalo de dosis de vacuna de Péptido del VIH α CD40.LIPO5. En el día 2, se añaden 100 U/ml de IL-2 al cultivo y a continuación, el medio se repone cada 2 días con 100 U/ml de IL-2. En el día 10, las células expandidas se estimulan durante 48 h con los péptidos largos individuales correspondiendo a las 5 secuencias de péptidos del VIH incorporadas en el rAb de fusión de péptidos del VIH α CD40.LIPO5. A continuación, los sobrenadantes del cultivo se cosechan y se evalúan para producción de citoquinas (con los linfocitos T con especificidades de receptor de linfocitos T [TCR] para secuencias peptídicas) usando ensayo de perlas Multiplex (Luminex). La producción de citoquinas específicas de antígeno detectadas en un ensayo de este tipo, si dependiera de la presencia de la vacuna de Péptido del VIH anti-CD40.LIPO5, refleja la absorción de vacuna por células de presentación de antígeno [APC] en el cultivo, y procesamiento [degradación proteolítica] y presentación de péptidos en MHC. Los complejos de antígeno-MHC son reconocidos por los linfocitos T con TCR que reconocen solamente el complejo de antígeno del VIH-MHC en particular. En un paciente con VIH, es probable que las células de este tipo sean linfocitos T de memoria que se expanden en el paciente como respuesta a la infección por el VIH.

Los epítomos de las 5 regiones de péptidos del VIH de la vacuna se pueden presentar por las APC. El esquema en la Fig. 5 se usó para someter a ensayo la expansión *in vitro* de linfocitos T específicos de péptido del VIH como respuesta a vacuna peptídica anti-CD40.LIPO5. Los resultados de 7 individuos se muestran en la Fig. 6 e indican que el rAb de fusión de péptidos del VIH α CD40.LIPO5 provocaba respuestas del IFN γ específicas de péptidos del VIH en todos los pacientes estudiados. Por lo tanto, the el rAb de fusión de péptidos del VIH α CD40.LIPO5 permite que las DC cruzadas presentan al menos 1 o 2 péptidos diferentes con respecto a los 5 péptidos dentro de la vacuna para los linfocitos T de cada individuo. Sin embargo, el conjunto de péptidos del VIH que estimulaba la producción de IFN γ era diferente para cada paciente - lo que más probablemente refleja diferentes combinaciones de linfocitos T de memoria a la especificidad del VIH.

La Fig. 6A-C muestra la producción de IFN γ específica de péptido del VIH en las PBMC de pacientes con VIH incubados con diversas concentraciones de vacuna de cadena peptídica anti-CD40.LIPO5. C es el grupo de control, que no recibió vacuna, y define la respuesta del valor inicial del cultivo a cada péptido.

La Fig. 7 es un resumen de respuestas de vacuna peptídica α CD40.LIPO5 frente a las 5 regiones peptídica es de 8

pacientes con VIH. Los datos se basan en la producción de IFN γ específica de péptido. La Fig. 7 muestra las respuestas específicas de antígeno observadas en 8 pacientes con VIH. Los datos demuestran que todas las regiones peptídicas del VIH en la vacuna tienen la capacidad de ser procesadas y presentadas a linfocitos T - suponiendo la situación probable que las respuestas a estos péptidos solamente se observarán si están presentes las células portadoras de TCR apropiadas. Por lo tanto, cada paciente tiene un espectro característico de células de este tipo.

La vacuna peptídica α CD40.LIPO5 puede provocar la proliferación de linfocitos T específicos de antígeno capaces de secretar un amplio espectro de citoquinas.

La Fig. 8A-C muestra que vacuna peptídica del VIH α CD40.LIPO5 provoca expansión de linfocitos T específicos de péptidos del VIH capaces de secretar múltiples citoquinas - una característica deseable en una vacuna. En la Fig. 8A-C, la vacuna peptídica del VIH α CD40.LIPO5 provoca respuestas específicas de péptidos gag253, nef66, nef116 y pol325 caracterizadas por la producción de múltiples citoquinas. Se trata del paciente A5.

Vacunación con péptido del VIH anti-CD40.LIPO5 HIV de las DC *ex vivo*.

La Fig. 9 muestra el protocolo para someter a ensayo una vacuna peptídica del VIH α CD40.LIPO5 para su capacidad para dirigir la expansión de linfocitos T específicos de antígeno dando como resultado una absorción dirigida por las DC y presentación de epítopos peptídicos en su complejo MHC de superficie. En resumen, los monocitos de paciente con VIH se diferencian en las DC mediante cultivo durante 2 días con IFN α y GM-CSF. A continuación, se añaden diferentes dosis de vacuna peptídica del VIH α CD40.LIPO5 o una mezcla de los 5 péptidos durante 18 h. Los linfocitos T autólogos se añadieron al cocultivo (a una proporción de 1:20) en el día 3. En el día 5, se añaden 100 U/ml de IL-2 al cultivo y a continuación, el medio se repone cada 2 días con 100 U/ml de IL-2. En el día 10, las células expandidas se vuelven a estimular durante 48 h con los vestidos largos individuales correspondiendo a las 5 secuencias de péptidos del VIH incorporadas en el rAb de fusión de péptidos del VIH α CD40.LIPO5. A continuación, los sobrenadantes del cultivo se cosechan y se evalúan para producción de citoquinas usando Luminex.

La Fig. 10A-B muestra la secreción de citoquinas como respuesta a péptidos del VIH a partir de cocultivos de células DC-linfocitos T tratados con diversas dosis de vacuna de péptidos del VIH α CD40.LIPO5. Se trata del paciente A10. Los resultados en el paciente A10 mostrados en la Fig. 10A-B demuestran la expansión de linfocitos T específicos de antígeno que corresponden a epítopos dentro de las regiones de péptidos del VIH gag17, gag253, y pol325. En la mayoría de los casos, esto está de acuerdo con respuestas entre vacuna peptídica del VIH α CD40.LIPO5 y vacuna no LIPO5 [mezcla de 5 péptidos del VIH no lipidados consecuencias corresponden a las de la vacuna de péptidos del VIH α CD40.LIPO5]. Por lo tanto, la vacuna de péptidos del VIH α CD40.LIPO5 funciona bien en este entorno *in vitro* cuando las DC cultivadas se procesan de forma eficaz y presentan los antígenos del VIH a linfocitos T. Esto es un ejemplo de uso de la vacuna de péptidos del VIH α CD40.LIPO5 para vacunación *ex vivo*, con lo que las 'DC vacunadas' se deberían crioconservar para futura reinyección en el mismo paciente.

Vacuna peptídica del VIH α CD40.LIPO5 – posible efecto inmunitario de las regiones conectoras flexibles. Es posible que en las secuencias conectoras flexibles que intercalan las secuencias de péptidos del VIH dentro de la vacuna de péptidos del VIH α CD40.LIPO5 por sí mismas contengan epítopos de linfocitos T. La Fig. 11 A-B muestra que el paciente A4 no parece que tenga una combinación significativa de linfocitos T de memoria con especificidades con respecto a las cinco secuencias conectoras flexibles dentro de la vacuna peptídica del VIH α CD40.LIPO5. En la Fig. 11 A-B, las PBMC del paciente A4 tratado con la vacuna de péptidos del VIH α CD40.LIPO5 provocan la expansión de linfocitos T específicos de antígeno con especificidad hacia la región gag253, pero no hacia las secuencias conectoras flexibles. Se usó el protocolo descrito en la Fig. 9, con los péptidos largos del conector flexible correspondientes en secuencia a las zonas en letra negra, los péptidos del VIH están en - letra negra-cursiva, mostrado en la secuencia que sigue a continuación.

La secuencia de cadena pesada de la vacuna peptídica del VIH α CD40.LIPO5 muestra las regiones conectoras flexibles en letra negra, las secuencias de unión subrayadas y regiones del péptido del VIH sombreadas en letra negra y cursiva.

QVTLKESGPGILQPSQTL~~SLTCSFSGFSLSTSGMGLSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSR~~
 LTISKDTSSNQVFLKITIVDTADAATYYCARSSHYGYGYGGYFDVWGAGTTVTVSSAKTKGPSVFL
 PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
 TKTYTCNV~~DHKPSNTKVDKR~~VESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP~~EVTCVVV~~
 DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
 PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
 VLDS~~DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV~~MHEALHNHYTQKSLSL~~SLGKASQTPTNTISVTP~~TN
 NSTPTNNSNPKPNPASEKIRLRPGGK~~KKYK~~LKHIVASSSVPTTSVHPTPTSVPPTPTKSSPASNPPI
 PVGEIYKRWILGLNKIVRMYSPTSILDASPTSTPADSSTITPTATPTATPTIKGASHTQGYFPDWQ~~N~~
 YTPGPGVRYPLTFGWLYKLASTVTPTATATPSAIVTTITPTATTKPASVGFVTPQVPLRPMTYKAA
 VDLSHFLKEKGLASTNGSITVAATAPTPTVNATPSAAASAI~~FQSSMTKILEPFRKQNP~~DIVIYQ
 YMDDLYAS. (SEQ ID NO.:21).

En la Fig. 12A, las PBMC del paciente A3 tratado con la vacuna de péptidos del VIH α CD40.LIPO5 provocan la expansión de linfocitos T específicos de antígeno con especificidades hacia las regiones gag253, nef66, y nef116, pero no hacia las secuencias conectoras flexibles. Se usó el protocolo descrito en la Fig. 1 se usó, con los péptidos largos del conector flexible correspondientes en secuencia a las zonas en letra negrita mostrados en la Fig. 8.

Las Fig. 12B-1 y B-2 muestran respuestas de linfocitos T específicas de antígeno de VIH provocadas a partir de las PBMC del paciente A17 con VIH incubadas con 30 nM de tres vacunas diferentes de dirección de DC del péptido HIV5. Las células se cultivaron durante 10 días con IL-2 y a continuación se estimularon competitivos largos individuales correspondientes a las 5 secuencias de péptidos del VIH incluidas dentro de las vacunas de dirección de DC. Después de 1 h, se añadió brefeldina A y la incubación continuó durante un periodo adicional de 5 horas antes de tinción para análisis de FACS. Las representaciones de FACS muestran tinción de IFN γ y CD8 en linfocitos T CD3 $^{+}$. Los círculos indican expansión provocada por vacuna significativa de células IFN γ^{+} en comparación con células de las PBMC cultivadas sin vacuna. Las células CD8 $^{-}$ son linfocitos T CD4 $^{+}$. Los datos muestran que esa vacuna anti-CD40.HIV5pep provocaba una expansión fuerte de linfocitos T CD8 $^{+}$ específicos de nef66 (N66) que no se observa con los otros vehículos de dirección de DC.

Se trata de datos basados en la cadena de péptidos del VIH LIPO5. Por ejemplo, la cadena Pesada anti-CD40 es anti-CD40_12E12.3F3_H-LV-hlgG4H-C-Flex-v1-Pep-gag17-f1-gag253-f2-nef116-f3-nef66-f4-pol 158] con la secuencia:

EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFS~~DYYMYWVRQTPEKRLEWVA~~YNSGGG~~STYYP~~DTVK
 GRFTISRDN~~AKNTLYLQMSRLK~~SEDTAMYYCARRGLPFHAMDYWGQGTSVTVSSAKTKGPSVFL
 APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG~~TK~~
 TYTCNV~~DHKPSNTKVDKR~~VESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP~~EVTCVVVDVS~~
 QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
 SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV~~MHEALHNHYTQKSLSL~~SLGKASQTPTNTISVTP~~TN~~NSTP
 TNNSNPKPNPASEKIRLRPGGK~~KKYK~~LKHIVASSSVPTTSVHPTPTSVPPTPTKSSPASNPPIPVGEIY
 KRWILGLNKIVRMYSPTSILDASPTSTPADSSTITPTATPTATPTIKGASHTQGYFPDWQ~~NY~~TPGPGV
 RYPLTFGWLYKLASTVTPTATATPSAIVTTITPTATTKPASVGFVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLK
 EKGLASTNGSITVAATAPTPTVNATPSAAASAI~~FQSSMTKILEPFRKQNP~~DIVIYQYMDDLYAS
 (SEQ ID NO.: 22).

La Fig. 12C-1 y C-2 es un estudio similar al que se muestra en la Fig. 12B, excepto en que las PBMC son de un paciente con VIH diferente (A2). Los datos muestran respuestas de linfocitos T CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ específicos de antígeno provocadas por anti-CD40.HIV5pep pero no por las otras vacunas de dirección de DC, o por una mezcla de los propios péptidos.

La Fig. 12D muestra que, basándose en el análisis de 15 respuestas de péptidos del VIH diferentes [5 regiones de péptidos de las que se toman muestras en 3 pacientes], la vacuna anti-CD40.HIV5pep es claramente superior a la mezcla de anti-DCIR.HIV5pep, anti-LOX-1.HIV5pep y no LIPO5 para provocar un amplio intervalo de respuestas de los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ específicas de Péptido del VIH.

La inmunogenicidad de las secuencias conectoras flexibles es de preocupación para el diseño de la vacuna de péptidos del VIH α CD40.LIPO5. Los conjuntos de datos limitados mostrados anteriormente, ensayo de recuerdo de linfocitos T con especificidades para epítomos dentro de las secuencias conectoras flexibles, sugiere que el repertorio humano frente a estas secuencias es variable. Además, la capacidad de estas secuencias para prepara respuestas *de novo* ésta sin someter al ensayo. Algunas respuestas hacia la vacuna de péptidos del VIH α CD40.LIPO5 en monos se pueden someter a ensayo usando la presente divulgación. Si era necesario, ciertos epítomos menos deseables dentro de estas regiones se pueden identificar con una combinación de métodos informáticos predictivos y barridos de estimulación de péptidos, y a continuación se pueden eliminar mediante introducción de cambios mutacionales que anulan la interacción de TCR.

Un anticuerpo humanizado de la divulgación incluye la región variable de cadena pesada (V_H) y una región variable de cadena ligera (V_L), en el que las regiones marco conservadas de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera son de un anticuerpo humano donante, y en el que las regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera (CDR) tienen una identidad de al menos un 80 %, 90 %, 95 % o superior con la CDR_L que tiene la secuencia de aminoácidos SASQGISNYLN (SEQ ID NO: 41), la región CDR_L que tiene la secuencia de aminoácidos YTSILHS (SEQ ID NO: 23) y la región CDR_{3L} que tiene la secuencia de aminoácidos QQFNKLPPT (SEQ ID NO: 23); y en el que las regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada comprenden una identidad de al menos un 80 %, 90 %, 95 % o superior con respecto a la CDR_{1H}, CDR_{2H} y CDR_{3H}, teniendo la región CDR_{1H} la secuencia de aminoácidos GFTFSDYYMY (SEQ ID NO: 24), teniendo la región CDR_{2H} la secuencia de aminoácidos YINSGGGSTYYPDTVKG (SEQ ID NO: 25), y teniendo la región CDR_{3H} la secuencia de aminoácidos RGLPFHAMDY (SEQ ID NO: 26). Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede comprender un armazón de VL que tenga una identidad de al menos un 95 % con el armazón de las SEQ ID NOS.: 2, 4, 5 o 7 y un armazón de VH que tenga una identidad de al menos un 95 % con el armazón de la SEQ ID NO: 1, 3 o 6. En otro aspecto, las secuencias de CDR donantes son de anti-CD40_12B4.2C10, anti-CD40_11B6.1C3 o combinaciones de sus cadenas pesadas o ligeras, y/o sus regiones variables y además, en las que el anticuerpo o fragmento del mismo se une de forma específica a CD40.

Ejemplo 3. Identificación sistemática de antígeno específico de próstata (PSA), Ciclina D1, MART-1, nucleoproteína del virus de la gripe (NP) y subunidad HA1 de hemaglutinina del virus de la gripe (H1N1, PR8) y péptido.

Internalización de mAb anti-CD40. 1×10^6 DC de IL-4 se incubaron durante 1 h en hielo con 3 mg/ml de gamma globulina humana en PBS que contenía BSA al 3 % para bloquear la unión no específica. Las células se pulsaron durante 30 minutos en hielo con mAb anti-CD40 etiquetado con Alexa 568 (todo a 20 ng/ml de concentración final en bloque no específico). A continuación, las células se lavaron y se permitió la internalización de anticuerpos unidos a superficie durante diferentes periodos de tiempo, entre 0 y 90 minutos, a 37 °C. Después de la internalización, las células se lavaron dos veces con PBS enfriado con hielo que contenía BSA al 1 % y azida sódica al 0,05 % (PBA) y se fijaron en metanol al 1 % enfriado con hielo - sin formaldehído (MFF) en PBS durante una noche a 4 °C. Las células se permeabilizaron en PBS al 3 % BSA que contenía saponina al 0,5 % (PBAS) durante 20 minutos a 4 °C, y se transfirieron a una placa de microtitulación de polipropileno de fondo redondo de 96 pocillos. Después de lavar dos veces con PBAS enfriado con hielo, las células se incubaron durante 1 h en hielo con 3 mg/ml de gamma globulina humana en PBAS. BODIPY-faloaloidina diluido en PBAS y se incubó con células durante 1 hora en hielo. Las células se tiñeron adicionalmente con TOPRO-II, como una contratinción nuclear. Se formaron imágenes de los portaobjetos en un microscopio confocal Leica SP1. Células. Los anticuerpos monoclonales para tinción de superficie celular se adquirieron en BD Biosciences (CA). Los monocitos (1×10^6 /ml) de donantes sanos se cultivaron en medio Cellgenics (Francia) que contenía GM-CSF (100 ng/ml) e IL-4 (50 ng/ml) r GM-CSF (100 ng/ml) e IFN α (500 Unidades/ml) (R&D, CA). Para las IFNDC, las células se alimentaron en el día 1 con IFN α y GM-CSF. Para las DC de IL-4, las mismas cantidades de citoquinas se suplementan en el medio en el día uno y en el día tres. Las PBMC se aislaron de capas leucocitarias usando gradientes de Percoll™ (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) mediante centrifugación en gradiente de densidad. Los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ totales se purificaron usando kits de StemCell (CA).

Péptidos. 15-mers (solapamiento de 11 aminoácidos) para antígeno específico de próstata (PSA), Ciclina D1, MART-1, nucleoproteína del virus de la gripe (NP) y subunidad HA1 de hemaglutinina del virus de la gripe (H1N1, PR8), se sintetizaron (Mimotopes).

Expresiones de cocultivo y citoquinas de las DC y linfocitos T. 5×10^3 DC cargadas con proteínas de fusión recombinantes (anti-CD40-HA1, Ig-HA1 de Control, anti-CD40-PSA, anti-CD40-Ciclina D1, anti-CD40-MART-1, anti-MARCO-MART-1, e Ig-MART-1 de control) se cocultivaron con 2×10^5 linfocitos T CD4⁺ etiquetados con CFSE durante 8 días. La proliferación se sometió ensayo midiendo la dilución de CFSE después de tinción de células con anticuerpo anti-CD4 etiquetado con APC.

Para medir la expresión de IFN γ intracelular, los linfocitos T CD4⁺ se volvieron a estimular con 1-5 μ M de los péptidos indicados durante 5 h en presencia de Brefeldina A. En experimentos separados, los linfocitos T CD4⁺ se volvieron a estimular con los péptidos indicados durante 36 h, y a continuación las citoquinas secretadas por los linfocitos T CD4⁺ se midieron con el instrumento Luminex. Los linfocitos T CD8⁺ se cocultivaron con las DC durante 10 días en presencia de 20 unidades/ml de IL-2 y 20 unidades/ml de IL-7. En el día 10 del cultivo, los linfocitos T CD8⁺ se tiñeron con anti-CD8 y los tetrámeros indicados.

Ensayo de CTL. En el día 10 del cultivo, se realizó un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 5 h. Las células T2 se pulsaron en primer lugar con ⁵¹Cr y a continuación se etiquetaron con 10 μ M de epítipo HLA-A2 de MART-1 o 1 nM de epítipo de M1 del virus de la gripe. Las células T2 sin péptido se usaron como control. La media de muestras por triplicado se calculó, y el porcentaje de lisis específica se determinó usando la siguiente fórmula: porcentaje de lisis específica = 100 x (liberación de ⁵¹Cr experimental – liberación de ⁵¹Cr de control)/(liberación de ⁵¹Cr máxima – liberación de ⁵¹Cr de control). La liberación máxima se refiere a recuentos de dianas en Triton X-100 al 2,5 %.

Preparación de mAb específicos para CD40 humano. Se produjeron proteínas de fusión de ectodominio.hlgG receptor (IgG1Fc humana) y AP (fosfatasa alcalina de placenta humana) para inmunización de ratones e identificación sistemática de los mAb, respectivamente. Un vector de mamífero para proteínas de fusión de IgFc humanas se modificó por ingeniería como se describe en [J. Immunol. 163: 1973-1983 (1999)]. El vector de expresión de mamíferos para proteínas de ectodominio.AP receptor se generó usando PCR para amplificar ADNc para los restos 133-1581 de AP (gb|BC0096471) a la vez que se añadía un sitio Xho I en fase proximal y un resto de His 6C-terminal distal seguido de un codón de parada de TGA y sitio de Not I. Este fragmento de Xho I - Not I reemplazaba la secuencia de codificación de Fc de IgG humana en el vector de ectodominio.IgG mencionado anteriormente. Las proteínas de fusión se produjeron usando el Sistema de Expresión FreeStyle™ 293 (Invitrogen, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante (1 mg de ADN de plásmido total con 1,3 ml de reactivo 293Fectin/l de transfección). El ectodominio.hlgG receptor se purificó con 1 ml de proteína A HiTrap mediante cromatografía por afinidad (GE Healthcare, CA) eluyendo con glicina 0,1 M, pH 2,7. Las fracciones se neutralizaron con Tris 2 M, y a continuación se dializaron frente a PBS.

Los mAb de ratón se generaron mediante tecnología convencional. En resumen, los ratones BALB/c de seis semanas de edad se inmunizaron i.p. con 20 μ g de proteína de fusión de ectodominio.hlgG receptor con adyuvante Ribi, a continuación se reforzaron con 20 μ g de antígeno diez días y quince días más tarde. Después de tres meses, los ratones se reforzaron de nuevo tres días antes de retirar los bazos. De tres a cuatro días después de un refuerzo final, el drenaje de los ganglios linfáticos (LN) se cosechó. Los linfocitos B del bazo o las células LN se fusionaron con células SP2/O-Ag 14 (ATCC). Los sobrenadantes del hibridoma se identificaron sistemáticamente para analizar los mAb específicos para la proteína de fusión del ectodominio receptor en comparación con el asociado de fusión solo, o al ectodominio receptor fusionado con fosfatasa alcalina [J. Immunol. 163: 1973-1983 (1999)]. Los pocillos positivos se identificaron sistemáticamente a continuación en FACS usando células 293F transfectadas de forma transitoria con plásmidos de expresión que codificaban los ADNc de receptor de longitud completa. Los hibridomas seleccionados se clonaron con células individuales y se expandieron en matraces CELLline (Integra, CA). Los sobrenadantes del hibridoma se mezclaron con un volumen igual de glicina 1,5 M, NaCl 3 M, 1 x PBS, pH 7,8 (tampón de unión) y se mueven con resina MabSelect (GE Healthcare, CA) (800 ml/5 ml de sobrenadante). La resina se lavó con tampón de unión y se eluyó con glicina 0,1 M, pH 2,7. Después de neutralizar con Tris 2 M, los mAb se dializaron frente a PBS.

Expresión y purificación de los mAb recombinantes. El ARN total se preparó a partir de células de hibridoma usando el kit RNeasy (Qiagen, CA) y se usó para síntesis de ADNc y PCR (kit SMART RACE, BD Biosciences) usando los cebadores en la posición 5' y cebadores en la posición 3' específicos de genes suministrados (mlgGK, 5'ggatggtgggaagatggatacagttggtgcagcatc3' (SEQ ID NO: 48); mlgG2a, 5'ccaggcatcctagagtcaccgaggagccagt3') (SEQ ID NO: 49). A continuación, los productos de PCR se clonaron (kit pCR2.1 TA, Invitrogen) y se caracterizaron mediante secuenciación de ADN (MC Lab, CA). Usando las secuencias obtenidas para los ADNc de región variable (V) de cadena pesada (H) y de cadena ligera (L) de ratón, los cebadores específicos se usaron para amplificar por PCR el péptido señal y las regiones V a la vez que se incorporaban sitios de restricción de franqueo para clonación en vectores de expresión que codifican regiones IgGK o IgG4H humanas cadena abajo. El vector para la expresión del mVK-hlgK quimérico se construyó mediante amplificación de los restos 401-731 (gi|631019371) flanqueados por sitios Xho I y Not I e insertando esto en el intervalo de Xho I - Not I de pIRES2-DsRed2 (BD Biosciences). La PCR se usó para amplificar la región Vk del mAb a partir del codón iniciador, adjuntando un sitio Nhe I o Spe I y a continuación CACC, a la región de codificación (por ejemplo, el resto 126 de gi|76779294|), adjuntando un sitio Xho I distal. El fragmento de PCR se clonó a continuación en el intervalo de Nhe I - Not I del vector mencionado anteriormente. La secuencia de IgGK humana de control corresponde a los restos 26-85 de gi|49257887| y los restos 67-709 de gi|21669402|. El vector de IgG4H humano de control corresponde a los restos 12-1473 de gi|19684072| con instituciones de S229P y L236E, que estabilizan un enlace disulfuro y anulan la interacción de FcR residual [J. Immunol. 164: 1925-1933 (2000)], insertada entre los sitios Bgl II y Not I de pIRES2-DsRed2 a la vez que se añade la secuencia 5'gctagctgattaattaa 3' en lugar del codón de parada. La PCR se usó para amplificar la región VH del mAb a partir del codón iniciador, adjuntando a continuación CACC un sitio Bgl II, a la región que codifica el resto 473 de gi|19684072|. El fragmento de PCR se clonó a continuación en el intervalo de Bgl II - Apa I del vector mencionado anteriormente.

Expresión y purificación de proteína de fusión de HA1 de la Gripe. La secuencia de codificación del antígeno HA1 de la Gripe es una proteína CipA [*Clostridium. thermocellum*] gi|479126| μ de los restos 147-160 que preceden a la

hemaglutinina [virus de la Gripe A (A/Puerto Rico/8/34(H1N1))] de gij126599271| restos 18-331 con un cambio de P321L y con 6 restos de His C-terminal que se insertan entre los sitios Nhe I y Not I del vector de la cadena Pesada sites para codificar anticuerpo recombinante-proteína s de fusión de HA1 (rAb.HA1). De forma análoga, el anticuerpo recombinante-proteínas de fusión de PSA (rAb.PSA) se codificaron por inserción de los restos 101-832 de antígeno específico de próstata de gij34784812| con la secuencia proximal GCTAGCGATACAACAGAACCTGCAACACCTACAACACCTGTAACAACACCGACAACAACACTT CTAGCGC (SEQ ID NO: 27) (sitio Nhe I y espaciador CipA) y un sitio Not I distal en el mismo vector de la cadena Pesada. Las proteínas de anticuerpo recombinante se expresaron y se purificaron como se ha descrito anteriormente para proteínas de fusión de hFc. En algunos casos, la región codificante del antígeno rAb y la región codificante de la cadena L correspondiente se transfirieron para separar vectores cethS-puro UCOE (Millipore, CA). El uso de vectores UCOE en combinación con una línea celular en suspensión sin suero adaptada previamente permitió una producción rápida de grandes cantidades de proteína [Cytotechnology 38, 43-46 (2002)]. Las células CHO-S se cultivaron en CD-CHO con GlutaMAX suplementos de medio HT (Invitrogen) se sembraron a 5×10^5 ml 24 h antes de su transfección en matraces Ehrlenmyer de Corning de 500 ml y se incubaron en CO₂ al 8 % a 125 rpm. En el día de la transfección, $1,2 \times 10^7$ células con viabilidad de al menos un 95 % se añadieron otros 5 mg/ml de puromicina directamente al cultivo y se permitió que la selección evolucionara ~10-14 días a la vez que seguía la viabilidad celular de seis días después de la transfección. El recuento de células viables disminuyó cuando la densidad viable es $\sim 2-3 \times 10^6$ /ml, las células se transfirieron a medio de selección recién preparado (CD CHO-S + CHO M5 con 2X GlutaMAX, 0,25 x Pen/Estrep, 10 mg/ml de Puromicina) a $1E6$ /ml. Se preparaban soluciones de reserva de células congeladas cuando la viabilidad alcanzada > 90 %. Las células se separaban en medio de selección cuando la densidad celular superaba 2×10^6 /ml hasta un aumento de 4×250 ml en matraces de 500 ml. El sobrenadante se cosechaba cuando la viabilidad celular disminuía por debajo de un 80 % con una densidad celular final máxima $\sim 7 \times 10^6$ /ml. Los niveles de endotoxina eran inferiores a 0,2 unidades/ml.

Expresión y purificación de proteínas Flu M1 y MART-1 recombinantes. La PCR se usó para amplificar el ORF del gen M1 de Gripe A/Puerto Rico/8/34/Mount Sinai (H1N1) a la vez que se incorporaba un sitio Nhe I distal al codón iniciador y un sitio Not I distal al codón de parada. El fragmento digerido se clonó en pET-28b(+) (Novagen), colocando el ORF de M1 en fase con una etiqueta de His6, codificando de este modo la proteína de M1 de His.Flu. Un derivado de pET28b (+) que codifica un dominio de cohesina de 169 restos N-terminal de *C. thermocellum* (en publicar) sentado entre los sitios Nco I y Nhe I expresaba Coh.His para expresión de Cohesina-Flex-hMART-1-PéptidoA-His, la secuencia

GACACCACCGAGGCCCGCCACCCCCACCCCCCGTGACCACCCCCACCACCACCGACCGGAAG
GGCACCACCGCCGAGGAGCTGGCCGGCATCGGCATCCTGACCGTGATCCTGGGCGGCAAGCGG
ACCAACAACAGCACCCCCACCAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCG (SEQ ID NO: 28)
(que codifica DTTEARHPHPVTPPTDRKGTAEELAGIGILTVLGGKRTNNSTPTKGEFCRYPSHWRP (SEQ ID NO: 29) – los restos en letra cursiva son del péptido limitado por HLA-A2 inmunodominante y los restos subrayados que rodean al Péptido son de MART-1) se insertó entre los sitios Nhe I y Xho I del vector mencionado anteriormente.

Las proteínas se expresaron en la cepa BL21 de *E. coli* (DE3) (Novagen) o T7 Express (NEB), se cultivaron en LB a 37 °C con selección para resistencia a kanamicina (40 µg/ml) y se agitó a 200 revoluciones/min hasta crecimiento de fase local indica media cuando se añadieron 120 mg/l de IPTG. Después de tres horas, las células se cosecharon por centrifugación y se almacenaron a -80 °C. Las células de *E. coli* de cada fermentación de 1 l se volvieron a suspender en 30 ml Tris 50 mM enfriado con hielo, EDTA 1 mM a pH 8,0 (tampón B) con 0,1 ml de Cócktel II inhibidores de proteasa (Calbiochem, CA). Las células se sonicaron en hielo 2x 5 min a ajuste 18 (Fisher Sonic Dismembrator 60) con un periodo de descanso de 5 min y a continuación se centrifugaron a 17.000 r.p.m. (Sorvall SA-600) durante 20 min a 4 °C. Para la purificación de His.Flu M1, la fracción de sobrenadante de lisado celular de 50 ml se pasó a través de 5 ml de perlas de Q Sepharose y se añadieron 6,25 ml de Tris 160 mM, imidazol 40 mM, NaCl 4 M a pH 7,9 al flujo continuo de Q Sepharose. Esto se cargó a 4 ml/min en una columna HP de quelación HiTrap a 5 ml cargada con Ni⁺⁺. La proteína unida a la columna se lavó con NaPO₄ 20 mM, NaCl 300 mM a pH 7,6 (tampón D) seguido de otro lavado con H₃COONa 100 mM a pH 4,0. La proteína unida se eluyó con H₃COONa 100 mM a pH 4,0. Las fracciones máximas se combinaron y se cargaron a 4 ml/min en una columna HiTrap S de 5 ml equilibrada con H₃COONa 100 mM a pH 5,5, y se lavó con el tampón de equilibrio seguido de elución con un gradiente de NaCl 0 - 1 M en NaPO₄ 50 mM a pH 5,5. Las fracciones máximas que eluye era aproximadamente NaCl 500 mM se combinaron. Para purificación de Coh.Flu M1.His, las células de 2 l de cultivo se lisaron como se ha mencionado anteriormente. Después de centrifugación, se añadieron 2,5 ml de Triton X114 al sobrenadante con incubación el hielo durante 5 min. Después de incubación adicional a 25 °C durante 5 min, el sobrenadante se separó del Triton X114 después de centrifugación a 25 °C. La extracción se repitió y el sobrenadante se pasó a través de 5 ml de perlas de Q Sepharose y se añadieron 6,25 ml de Tris 160 mM, imidazol 40 mM, NaCl 4 M a pH 7,9 al flujo continuo de Q Sepharose. A continuación, la proteína se purificó mediante cromatografía con quelación de Ni⁺⁺ como se ha descrito anteriormente y eluyendo con imidazol 0-500 mM en tampón D.

La Fig. 13 muestra la internalización de mAb anti-CD40:IL-4DC. Las de DC IL-4 se trataron con 500 ng/ml de anti-CD40-Alexa 568. La Fig. 14 muestra proliferación de linfocitos T CD4 y CD8 por las DC dirigidas con anti-CD40-HA1. 5 x 10³ IFNDC cargadas con 2 ug/ml de anti-CD40-HA o Ig-HA1 de control se cocultivaron con linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ autólogos etiquetados con CFSE (2 x 10⁵) durante 7 días. A continuación, las células se tiñeron con anticuerpos anti-CD4 o anti-CD8. La proliferación celular se sometió a ensayo midiendo la dilución de CFSE. La Fig. 15 muestra una valoración de proteína de fusión de HA1 en la proliferación de linfocitos T CD4⁺. Las IFNDC (5 K) cargadas con proteínas de fusión se cocultivaron con linfocitos T CD4⁺ etiquetados con CFSE (200 K) durante 7 días. La Fig. 16 muestra las IFNDC dirigidas con linfocitos T CD4⁺ específicos de HA1 activados con anti-CD40-HA1. Los linfocitos T CD4⁺ se volvieron a estimular con las DC cargadas con 5 uM de los péptidos indicados, y a continuación el IFN γ intracelular se sometió a tinción. La Fig. 17 muestra las IFNDC dirigidas con linfocitos T CD4⁺ específicos de HA1 activados con anti-CD40-HA1. Los linfocitos T CD4⁺ se volvieron a estimular con las DC cargadas con los péptidos indicados durante 36 h, y a continuación el sobrenadante del cultivo se analizó para la medición de IFN γ . La Fig. 18 muestra que el de CD40 dirección da como resultado la sensibilización cruzada de linfocitos T CD8⁺ específicos de MART-1. Las IFNDC (5 K/pocillo) cargadas con proteínas de fusión se cocultivaron con linfocitos T CD8⁺ purificados durante 10 días. Las células se tiñeron con anti-CD8 y tetrámero. Las células son de donantes sanos (HLA-A*0201+). La Fig. 19 muestra que la dirección de CD40 da como resultado la sensibilización cruzada de linfocitos T CD8⁺ específicos de MART-1 (Resumen de 8 experimentos repetidos usando células de diferentes donantes sanos). La Fig. 20 muestra que CTL CD8⁺ inducidos con las IFNDC dirigidos con anti-CD40-MART-1 son funcionales. Los linfocitos T CD8⁺ cocultivados con las IFNDC dirigidos con proteínas de fusión se mezclaron con células T2 cargadas con epítipo de péptido 10 uM. La Fig. 21 muestra que CTL CD8⁺ inducidos con las IFNDC dirigidos con anti-CD40-Flu M1 son funcionales. Los linfocitos T CD8⁺ cocultivados con las IFNDC dirigidos con proteínas de fusión se mezclaron con células T2 cargadas con epítipo de péptido 1,0 nM. La Fig. 22 muestra un esbozo del protocolo para someter a ensayo la capacidad de una vacuna formada por anti-CD4012E12 unido a PSA (antígeno específico de próstata) para provocar la expansión de una población de linfocitos T sin tratamiento previo. Los linfocitos T CD4⁺ específicos de PSA corresponden a una matriz amplia de epítopos de PSA. En resumen, las DC obtenidas mediante cultivo con IFN α y GM-CSF de monocitos de un donante sano se incuban con la vacuna. Al día siguiente, las células se colocan en medio recién preparado y se añaden linfocitos T CD4⁺ puros del mismo donante. Varios días más tarde, se añaden péptidos de PSA y, después de cuatro horas, se determinan los niveles de gamma-IFN secretado en los sobrenadantes del cultivo.

La Fig. 23 muestra que muchos péptidos de PSA provocan potentes respuestas de producción de gamma-IFN lo que indica que anti-CD4012E12 y algunos agentes anti-CD40 similares pueden suministrar antígeno a las DC de forma eficaz, dando como resultado la sensibilización de respuestas inmunes frente a múltiples epítopos del antígeno. La formación de mapas de péptidos de antígeno PSA. 5 x 10³ IFNDC cargadas con 2 ug/ml de anti-CD40-PSA se cocultivaron con linfocitos T CD4⁺ autólogos purificados (2 x 10⁵) durante 8 días. A continuación, las células se volvieron a estimular con 5 uM de péptidos individuales obtenidos a partir de PSA durante 36 h. La cantidad de IFN γ se midió con Luminex. Las células son de donantes sanos.

La Fig. 24 muestra que las DC dirigidas con anti-CD40-PSA inducen respuestas de linfocitos T CD8⁺ específicas de PSA. Las IFNDC se dirigieron con 1 ug de proteína de fusión de mAb con PSA. Los linfocitos T CD8⁺ autólogos purificados se cocultivaron durante 10 días. Las células se tiñeron con anti-CD8 y tetrámero de PSA (KLQCVDLHV). Las células son de un donante sano positivo para HLA-A*0201. Los resultados demuestran que anti-CD40 suministra PSA de forma eficaz a las DC, que a su vez provocan la expansión de específicos linfocitos T CD8⁺ de PSA. En resumen, 5 x 10³ IFNDC cargadas con 2 ug/ml de anti-CD40-PSA se cocultivaron con linfocitos T CD8⁺ autólogos purificados (2 x 10⁵) durante 10 días. A continuación, las células se tiñeron con tetrámero. Las células son de donante sano positivo para HLA-0*201.

La Fig. 25 es un esquema (parte izquierda) y la producción de IFN γ por linfocitos T de las combinaciones de péptidos y control para el Donante 2. 5 x 10³ IFNDC cargadas con 2 ug/ml de anti-CD40-Ciclina D1 se cocultivaron con linfocitos T CD4⁺ autólogos purificados (2 x 10⁵) durante 8 días. A continuación, las células se volvieron a estimular con 5 uM de péptidos individuales obtenidos a partir de Ciclina D1 durante 5 h en presencia de Brefeldina A. Las células se tiñeron para la medición de la expresión de IFN γ intracelular.

La Fig. 26 muestra una exploración del péptido y producción de IFN γ por linfocitos T obtenida a partir de las combinaciones de péptidos mostradas en la Fig. 25 y control para el Donante 2. 5 x 10³ IFNDC cargadas con 2 ug/ml de anti-CD40-Ciclina D1 se co-cultivaron con linfocitos T CD4⁺ autólogos purificados (2 x 10⁵) durante 8 días. A continuación, las células se volvieron a estimular con 5 uM de péptidos individuales obtenidos a partir de Ciclina D1 durante 5 h en presencia de Brefeldina A. Las células se sometieron a tinción para medición de la expresión de IFN γ intracelular.

En conclusión, el suministro de antígenos a las DC, las células de presentación de antígenos más potentes, a través de CD40 es una manera eficaz para inducir y activar antígeno específico para inmunidad mediada por linfocitos T tanto CD4⁺ como CD8⁺. Por lo tanto, las vacunas preparadas con anti-CD40 mAb inducirán una inmunidad potente frente a cáncer e infecciones.

Información del péptido:

Secuencias de HA1:

5 MKANLLVLLCALAAADADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLLED SHNGKLCR (SEQ ID NO: 30)
 LKGIAPLQLGKCNIA GWLLGNPECDPLLPVRSWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELRE (SEQ ID NO: 31)
 QLSSVSSFERFEIFPKESSWP NHNTNGVTAACSHEGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPKLNKNS (SEQ ID NO: 32)
 YVNKKGKEVLVLWGIHPPNSKEQQNLYQENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERPKVRDQA (SEQ ID NO: 33)
 GRMNYWTLKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTKCQTPLG (SEQ ID NO: 34)
 10 AINSSLPYQNIHPVTIGCEPKYVRS AKLRMVTGLRNIPSI (SEQ ID NO: 35)

Secuencias de péptidos en la Fig. 17

Péptido 22: SSFERFEIFPKESSWPN (SEQ ID NO: 36)
 15 Péptido 45: GNLIAPWYAFALSRGFG (SEQ ID NO: 37)
 Péptido 46: WYAFALSRGFGSGIITS (SEQ ID NO: 38)

Secuencias de NP:

20 MASQGTKRSYEQMETDGERQ NATEIRASV GKMIGGIGRFYIQMCTELKLSDYEGRLIQNS (SEQ ID NO: 39)
 LTIERMVLSAFDERRNKYLEEHPSAGKDPKKTGGPIYRRVNGKWMRELILYDKEEIRRIW (SEQ ID NO: 30)
 RQANNGDDATAGLTHMMIWHSNLNDATYQRTRALVRTGMDPRMCSLMQGSTLPRRSGAAG (SEQ ID NO: 41)
 AAVKGVGTMMELVRMIKRGINDRNFWRGENGKRKTRIA YERM CNILKGFQTAAQKAMMD (SEQ ID NO: 42)
 QVRESRNP GNAEFEDLTLARSALILRGSVAHK SCLPACVYGP AVASGYDFEREGYSLVG (SEQ ID NO: 43)
 25 IDPFRLQNSQVYSLIRPNENPAHKSQ LVVMACHSAAFEDL RVLSFIKGT KVLPRGKLS (SEQ ID NO: 44)
 RGVQIASNENMETMESSTLELR SRYWAIRTRSGGNTNQQRASAGQISIQPTFSVQRNL PF (SEQ ID NO: 45)
 DRTTMAAFNGNTEGRTSDMRTEIIRMMESARPEDVSFQGRGVFELSDEKAASPIVPSFD (SEQ ID NO: 46)
 MSNEGSYFFGDNAEEYDN (SEQ ID NO: 48)

30 Secuencias de péptidos en la Fig. 23

Péptido 22: GKWVRELVL YDKEEIRR (SEQ ID NO: 49)
 Péptido 33: RTGMDPRMCSLMQGSTL (SEQ ID NO: 50)
 Péptido 46: MCNILKGFQTAAQKAM (SEQ ID NO: 51)

35 Secuencia de antígeno específico de próstata (PSA)

MWVPPVFLTLSVTWIGAAPLILSRIVGGWECEKHSQPWQVLVASRGRAVCGGVLVHPQWV (SEQ ID NO: 52)
 40 LTAAH CIRNKS VILLGRHSLFHPEDTGQVFQVSHSFPHP LYDMSLLKNRFLRPGDDSSHD (SEQ ID NO: 53)
 LMLLRLSEPAELTDAVKVMDLPTQEPALGTTTCYASGWG SIEPEEFLTPKKLQCVDLHVIS (SEQ ID NO: 54)
 NDVCAQVHPQVKTKFMLCAGRWTGGKSTCSGDSGGPLVCNGVLQGITSWGSEPCALPERP (SEQ ID NO: 55)
 SLYTKWHYRKWIKDTIVANP (SEQ ID NO: 56)

45 Secuencias de péptidos en la Fig. 23

Péptido 1: APLILSRIVGGWECE (SEQ ID NO: 57)
 Péptido 4: ECEKHSQPWQVLVAS (SEQ ID NO: 58)
 50 Péptido 25: GDDSSHDLMLLRLSE (SEQ ID NO: 59)
 Péptido 26: SHDLMLLRLSEPAEL (SEQ ID NO: 60)
 Péptido 49: SGDSGGPLVCNGVLQ (SEQ ID NO: 61)
 Péptido 54: GSEPCALPERPSLYT (SEQ ID NO: 62)
 Péptido 56 : ERPSLYTKVVHYRKW (SEQ ID NO: 63)
 55 Péptido 58 : VVHYRKWIKDTIVAN (SEQ ID NO: 64)

Secuencia de ciclina D1

MRSYRFS DYLHMSVSFSNDMDLFCGEDSGVFSGESTVDFSSSEVDSWPGDSIACFIEDER (SEQ ID NO: 65)
 60 HFVPGHDYLSRFQTRSLDASAREDSVAWILKVQAYYNFQPLTAYLAVNYMDRFLYARRLP (SEQ ID NO: 66)
 ETSGWPMQLLAVACL SLAAKMEEILVPSLFD FQVAGVKYLFEAKTIKRMELLVLSVLDWR (SEQ ID NO: 67)
 LRSVTPFDIFSFAYKIDPSGTF LGFFISHATEIILSNIKEASFLEYW PSSIAAAAILCV (SEQ ID NO: 68)
 ANELPSLSSVVNPHESPETWCDGLSKEKIVRCYRLMKAMAIENRNLNTPKVIKLRVSVR (SEQ ID NO: 69)
 ASSTLTRPSDESSFS SSSPCKRRKLSGYSWVGDETSTSN (SEQ ID NO: 70)

65 Secuencias de péptidos en la Fig. 26.

Péptido 7: DRVLRAMLKAEETCA (SEQ ID NO: 71)
 Péptido 8: RAMLKAEETCAPSVS (SEQ ID NO: 72)
 Péptido 10: TCAPSVSYFKCVQKE (SEQ ID NO: 73)

5 Antígeno MART-1. MART-1 es un antígeno de diferenciación melanocítica asociada con tumor. La vacunación con antígeno MART-1 puede estimular una respuesta de los linfocitos T citotóxicos para el hospedador frente a células tumorales que expresan el antígeno de diferenciación melanocítica, dando como resultado la lisis de células tumorales.

10 La Fig. 27 muestra la expresión y diseño de la construcción para anticuerpos peptídicos anti-CD40-MART-1. La Fig. 28 es un resumen de los epítomos inmuno dominantes de CD4⁺ y CD8⁺ para MART-1. Las Figs. 27 y 28 muestran el uso de la tecnología de conector flexible para permitir la expresión satisfactoria del receptor anti-DC recombinante que dirige anticuerpos fusionados a partes significativas (~2/3) del MART-1 humano. El anticuerpo recombinante fusionado en el extremo C-terminal de la cadena Pesada con toda la región de codificación de MART-1 no se secreta en absoluto a partir de producción de células de mamífero [no se muestra]. El aducto Flex-v1-hMART-1-Pep-3-f4-Pep-1 está particularmente bien expresado y es un aspecto preferente de una vacuna de dirección a MART-1, ya que el aducto Flex-v1-hMART-1-Pep-3-f4-Pep-1-f3-Pep-2 es el que porta una carga máxima de epítomos de MART-1. La diapositiva 2 de la presentación de MART-1 en Powerpoint muestra que estos aductos se pueden añadir de forma satisfactoria a múltiples vehículos de receptor anti-DC.

20 La secuencia que sigue a continuación es una secuencia de péptidos de hMART-1 - cadena Pesada de la proteína de fusión de pep3-pep1-pep2 en la que cada secuencia de péptidos de hMART1 [en letra negrita y cursiva] está separada por un espaciador inter-péptido f [que se muestra en letra negrita]. En este caso, un conector largo de 27 aminoácidos, flex-v1(v1) [en letra cursiva], obtenido a partir del precursor B de formación de armazones de anclaje celulosómico [*Bacteroides cellulosolvens* – descrito en la divulgación de la invención de vacuna de gag-nef] se insertó entre el extremo C-terminal de la cadena Pesada y en la secuencia de espacios flexibles de péptidos de hMART1. Los restos de AS subrayados son secuencias de unión.

30 [manti-CD40_12E12.3F3_H-LV-hlgG4H-C-Flex-v1-hMART-1-Pep-3-f4-Pep-1] C981 es:

EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSKATSGFTFSDDYYMYWVRQTPEKRLEWVAYINSGGGSTYYPDTVK
GRFTISRDNKNTLYLQMSRLKSEDTAMYYCARRGLPFHAMDYWGQGTSVTVSSAKTKGPSVFPL
APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTK
TYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPEFEGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS
QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKLSLSLGLKASQTPTNTISVTPTNNSPT
NNSNPKPNPASGFDHRDSKVSSLQEKNCEPVVPNAPPAYEKLSAEQSPPPYSPASTNGSITVAATAPT
VTPTVNATPSAAASMPREDAHFIYGYPKKGHGHSYTTAEAAAGIGILTVILGAS (SEQ ID NO.:74)

[manti-CD40_12E12.3F3_H-LV-hlgG4H-C-Flex-v1-hMART-1-Pep-3-f4-Pep-1-f3-Pep-2] C978 es:

EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSDDYMYWVRQTPEKRLEWVAYINSGGGSTYYPDTVK
 GRFTISRDNANTLYLQMSRLKSEDTAMYCYCARRGLPFHAMDYWGQTSVTVSSAKTKGPSVFPL
 APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGK
 TYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
 DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
 SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGKASQTPTNTISVTPTNNSPT
 NNSNPKPNPASGFDHRDSKVSLQEKNCEPVVPNAPPAYEKLSAEQSPPPYSPASTNGSITVAATAPT
VTPTVNATPSAAASMPREDAHFIYGYPKKGHGHSYTTAEAAAGIGILTVILGAS (SEQ ID
 NO.:75)

[mAnti-DCIR_9E8_H-LV-hlgG4H-C-Flex-v1-hMART-1-Pep-3-f4-Pep-1] C1012 es:

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGLSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSR
 LTISKDTSSNQVFLKITIVDTADAATYYCARSSHYYGYGGYFDVWGAGTTVTVSSAKTKGPSVF
 PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
 TKTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
 DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
 PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
 VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGKASQTPTNTISVTPTNNS
 TPTNNSNPKPNPASGFDHRDSKVSLQEKNCEPVVPNAPPAYEKLSAEQSPPPYSPASTNGSITVAATA
PTVTPTVNATPSAAASMPREDAHFIYGYPKKGHGHSYTTAEAAAGIGILTVILGAS (SEQ ID NO.:76)

5

[mAnti-DCIR_9E8_H-LV-hlgG4H-C-Flex-v1-hMART-1-Pep-3-f4-Pep-1-f3-Pep-2] C1013 es:

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGLSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSR
 LTISKDTSSNQVFLKITIVDTADAATYYCARSSHYYGYGGYFDVWGAGTTVTVSSAKTKGPSVF
 PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
 TKTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
 DVSQPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS
 SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
 DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGKASQTPTNTISVTPTNNSPT
 TNNSNPKPNPASGFDHRDSKVSLQEKNCEPVVPNAPPAYEKLSAEQSPPPYSPASTNGSITVAATAP
TVTPTVNATPSAAASMPREDAHFIYGYPKKGHGHSYTTAEAAAGIGILTVILGAS (SEQ ID
 NO.:77)

10

Secuencia de ADN de MART-1:

Construcciones de MART-1 con 3 péptidos, Los sitios de inicio/parada están subrayados, el péptido 1 está en letra
 negra, el péptido 2 está en letra negra-cursiva y el péptido 3 está subrayado en letra negra y subrayado:

AACACCGACAACAACAGATGATCTGGATGCAGCTAGTGGGTTTGATCATCGGGACAGCAAAG
 TGTCTCTTCAAGAGAAAACTGTGAACCTGTGGTTCCCAATGCTCCACCTGCTTATGAGAA
 ACTCTCTGCAGAACAGTCACCACCACCTTATTCACCTGCTAGTACCAACGGCAGCATCACCG
 TGGCCGCCACCGCCCCACCGTGACCCCCACCGTGAACGCCACCCCCAGCGCCGCCGCTAGTAT
 GCCAAGAGAAGATGCTCACTTCATCTATGGTTACCCCAAGAAGGGGCACGGCCACTCTTACACCA
 CGGCTGAAGAGGGCCGCTGGGATCGGCATCCTGACAGTGATCCTGGGAGCTAGTACCGTGACCCC
 CACCGCCACCGCCACCCCCAGCGCCATCGTGACCACCATCACCCCCACCGCCACCACCAAGCCC
 GCTAGTGTCTTACTGCTCATCGGCTGTTGGTATTGTAGAAGACGAAATGGATAACAGAGCCT
TGATGGATAAAAGTCTTCATGTTGGCACTCAATGTGCCTTAACAAGAAGATGCCACAAG
AAGGG*ga*GCGGCCGCATCGAAGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCA
 TGC (SEQ ID NO.:78)

5 MART1 - Péptido 3, la parte en letra cursiva es el epítipo inmunodominante de CD4⁺.

GFDHRDSKVSLEK**NCEPVVPNAPPAYEKLSAEQSPPPYSP** (SEQ ID NO: 79) Flex-4
ASTNGSITVAATAPTPTVNATPSAAAS (SEQ ID NO: 80)

10 MART1 - Péptido 1, la parte en letra cursiva es el epítipo inmunodominante de CD4⁺ y la parte subrayada-con
 letra cursiva es el epítipo inmunodominante de CD8⁺.

*MPREDAHFIYGYPKKGHGHHSYTT*AEEAAGIGILTVILG (SEQ ID NO: 81)
 Flex-3: ASTVTPTATATPSAIVTTITPTATTKPAS (SEQ ID NO: 82)

15 MART1 - Péptido 2, la parte en letra cursiva es el epítipo inmunodominante de CD4⁺.
 VLLIGCWYCRRRNGYRALMDKSLHVG**TQCALTRRCPQEG** (SEQ ID NO: 83)
 Construcciones de MART1 con dos péptidos:

20 El Péptido 3 está en letra **negrita-cursiva-subrayada**, flex-4 está en letra **negrita** y el Péptido 1 está en letra
negrita-cursiva-subrayada:

GFDHRDSKVSLEKNCEPVVPNAPPAYEKLSAEQSPPPYSP**ASTNGSITVAATAPTPTVNATPSA**
AASMPREDAHFIYGYPKKGHGHHSYTTAEEAAGIGILTVILGAS (SEQ ID NO.:84)

25 Secuencia de Proteínas: C978. rAB-cetHS-puro[manti-CD40_12E12.3F3_H-LV-hlgG4H-C-Flex-v1-hMART-1-
 Pep-3 (**letra negrita-cursiva-subrayada**)-f4 (**letra negrita**)-Pep-1 (**letra negrita-cursiva**)-f3 (**letra cursiva**)-Pep-2
 (**letra negrita-subrayada**)

MNLGLSLIFLVLVLKGVQCEVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLE
 WVAYINSGGGSTYYPDTVKGRFTISRDNANTLYLQMSRLKSEDTAMYCARRGLPFHAMDYWG
 QGTSVTVSSAKTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFEGGSPVFLFPPK
 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
 LGKASQTPTNTISVTPTNNSPTNNSNPKPNPASGFDHRDSKVSLOEKNCEPVVPNAPPAYEKLSAEQ
SPPPYSPASTNGSITVAATAPTPTVNATPSAAASMPREDAHFIYGYPKKGHGHSYTTAEEAAGI
GILTVILGASTVPTATATPSAIVTTITPTATTKPASVLLIGCWYCRRRNGYRALMDKSLHVGTOCA
LTRRCPOEGAS (SEQ ID NO.:85)

Secuencia de Proteínas: C981. rAB-cethS-puro[manti-CD40_12E12.3F3_H-LV-hlgG4H-C-Flex-v1-hMART-1-Pep-3 (letra negrita-cursiva-subrayada)-f4-(letra negrita)-Pep-1](letra negrita-subrayada)

5

MNLGLSLIFLVLVLKGVQCEVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLE
 WVAYINSGGGSTYYPDTVKGRFTISRDNANTLYLQMSRLKSEDTAMYCARRGLPFHAMDYWG
 QGTSVTVSSAKTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFEGGSPVFLFPPK
 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
 LGKASQTPTNTISVTPTNNSPTNNSNPKPNPASGFDHRDSKVSLOEKNCEPVVPNAPPAYEKLSAEQ
SPPPYSPASTNGSITVAATAPTPTVNATPSAAASMPREDAHFIYGYPKKGHGHSYTTAEEAA
GIGILTVILGAS (SEQ ID NO.:86)

Antígeno GP100. El antígeno GP100 es un antígeno asociado con el melanoma. Cuando se administra en una formulación de vacuna, el antígeno gp100 puede estimular una respuesta del sistema inmunitario limitada por HLA-A2.1 de linfocitos T citotóxicos frente a tumores que expresan este antígeno, que puede dar como resultado una reducción del tamaño del tumor.

10

La región codificante del ectodominio de GP100 fusionada con la región codificante de la cadena Pesada del anticuerpo recombinante no está secreta en absoluto por la producción de células de mamífero [no se muestra]. La secuencia total se muestra a continuación – los restos en letra cursiva son la secuencia líder y el dominio transmembrana, los péptidos están en letra negrita-cursiva y el dominio transmembrana está en letra cursiva-subrayada.

15

*MDLVLRCLLHLAVIGALLAVGATKVPNRQDWLGVSRQLRTKAWNRQLYPEWTEAQRLLDCWRGGQ
VSLKVSNDGPTLIGANASFSIALNFPQSQKVLDPDGQVIWVNNTIINGSQVWGGQPVPYQETDDACIFP
DGGPCPSGSWSQKRSFVYVW**KTWGQYWQV**VLGGPVSGLSIGTGRAMLGTHTMEVTVYHRRGSRSY
VPLAHSSSAFT**ITDQVPFSV**SVSQLRALDGGNKHFLRNQPLTFALQLHDPSGYLAEADLSYTWDFGD
SSGTLISRALVVTHT**YLEPGPVT**AQVVLQAAIPLTSCGSSPVPGTDDGHRPTAEAPNTTAGQVPTTEV
VGTTPGQAPTAEPSTTSVQVPTTEVISTAPVQMPTAESTGMTPEKVPVSEVMGTTLAEMSTPEATG
MTPAEVSIVVLSGTAAQVTTTEWVETTARELPIPEPEGPDASSIMSTESITGSLGPLLDGTATLRLVK
RQVPLDCVLYRYGSFSVTLDIVQGIESAEILQAVPSGEGDAFELTVSCQGGPLKEACMEISSPGCQPP
AQRLLCQPVLPSPACQLVLHQILKGGSGTYCLNVSLADTNSLAVVSTQLIMPGQEAGLGQ**VPLIVGILL**
VLMAVVLASLIYRRRLMKQDFSVPLPHSSSHWLRLPRIFCSPIGENSPLLSGQQV (SEQ ID NO.:87)*

5 Algunas secuencias peptídicas conocidas limitadas por HLA-A0201 son: GP100 M: 209-217 (2M): IMDQVPFSV (SEQ ID NO: 88); 209-217 WT: ITDQVPFSV (SEQ ID NO: 89) GP100 M: 280-288 (9V): YLEPGPVTV (SEQ ID NO: 90) 280-288 WT: YLEPGPVT (SEQ ID NO: 91) GP100 WT: 154-162: KTWGQYWQV (SEQ ID NO: 92).

10 La Fig. 29-33 muestra los aductos de gp100 que se expresaban de forma satisfactoria cuando secretaban vacunas de dirección a receptor anti-DC. Estos empleaban el uso de las secuencias conectoras flexibles y fragmentación y barajado de la región codificante del ectodominio de gp100. Se describen aspectos preferentes de aductos de vacuna de gp100.

15 La Fig. 29 muestra la expresión y diseño de la construcción para anticuerpos de péptido anti-CD40-gp100. La Fig. 30 muestra el diseño para anticuerpos de péptido anti-CD40-gp100 adicional. La Fig. 31 muestra la expresión y diseño de la construcción para anticuerpos de péptido anti-CD40-gp100 adicional. La Fig. 32 es un resumen de los epítomos inmunodominantes de CD4⁺ y CD8⁺ para gp100. La Fig. 33 muestra la expresión y diseño de la construcción para anticuerpos de péptido anti-CD40-gp100 adicional.

20 rAB-cetHS-puro[manti-CD40_12E12.3F3_H-LV-hlgG4H-C-Flex-hgp100-Pep-1-f4-Pep-3-f3-Pep-4-f4-Pep-5-f3-Pep-2] C1285, los péptidos están en letra negrita-cursiva, los conectores flexibles están en letra negrita y los restos de AS subrayados son secuencias de unión:

**EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLEWVAYINSGGGSTYYPDTVK
GRFTISRDNKNTLYLQMSRLKSEDTAMYCYCARRGLPFHAMDYWGQGTSVTVSSAKTKGPSVFPL
APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK
TYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFEGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK**ASDTTEPATPTTPVTPTT****

*TKVPRNQDWLGVSRQLRTKAWNRQLYPEWTEAQRLLDCWRGGQVSLKVSNDGPTLIGANASFSIAL
 NFPGSQKVLDPDGGQVIWVNNIINGSQVWGGQPVYPQETDDACIFPDGGGPCPSGSWSQKRSFVYVWK
 TWGQYWQVLGGPVSGLSIGTGRAMLGTHMEVTVYHRRGSQSYVPLAHSSSAFTITDQVPFVSVS
 QLRALDGGNKHFLRNQASTNGSITVAATAPTPTPTVNATPSAAASGTTDGHRTTEAPNTTAGQV
 PTTEVVGTTTPGQAPTAEPSGTTSVQVPTTEVISTAPVQMPTAESTGMTPEKVPVSEVMGTTLAEMST
 PEATGMTPAEVSIVVLSGTTAAASTVTPTATATPSAIVTTITPTATTKPASQVTTTEWVETTARELPI
 PEPEGPDASSIMSTESITGSLGPLLDGTATLRLVKRQVPLDCVLYRYGSFSVTLDIVQASTNGSITVA
 ATAPTPTPTVNATPSAAASGIESAEILQAVPSGEGDAFELTVSCQGGLPKEACMEISSPGCQPPAQR
 LCQPVLPSACQLVLHQILKGGSGTYCLNVSADTNSLAVVSTQLIVPGILLTGQEAGLGQASTVTPT
 ATATPSAIVTTITPTATTKPASPLTFALQLHDPSGYLAEADLSYTWDFGDSSGTLISRALVVTHTYLE
 PGPVTAQVVLQAAIPLTSCGSSPVPAS (SEQ ID NO.:93)*

rAB-cetHS-puro[hlgG4H-C-Flex-hgp100-Pep-1-f4-Pep-3-f3-Pep-4-f4-Pep-5-f3-Pep-2] C1286:

RLQLQESGPGLLKPSVTLSTCTVSGDSVASSSYWGWVRQPPGKLEWIGTINFSGNMYYSPLRS
 RVTMSADMSENSFYLKLDVTAADTAVYYCAAGHLMGFGAHWGQKLVSPASTKGPSVFPL
 APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGK
 TYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
 SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLKASDTTEPATPTTPVTTPTT
*TKVPRNQDWLGVSRQLRTKAWNRQLYPEWTEAQRLLDCWRGGQVSLKVSNDGPTLIGANASFSIAL
 NFPGSQKVLDPDGGQVIWVNNIINGSQVWGGQPVYPQETDDACIFPDGGGPCPSGSWSQKRSFVYVWK
 TWGQYWQVLGGPVSGLSIGTGRAMLGTHMEVTVYHRRGSQSYVPLAHSSSAFTITDQVPFVSVS
 QLRALDGGNKHFLRNQASTNGSITVAATAPTPTPTVNATPSAAASGTTDGHRTTEAPNTTAGQV
 PTTEVVGTTTPGQAPTAEPSGTTSVQVPTTEVISTAPVQMPTAESTGMTPEKVPVSEVMGTTLAEMST
 PEATGMTPAEVSIVVLSGTTAAASTVTPTATATPSAIVTTITPTATTKPASQVTTTEWVETTARELPI
 PEPEGPDASSIMSTESITGSLGPLLDGTATLRLVKRQVPLDCVLYRYGSFSVTLDIVQASTNGSITVA
 ATAPTPTPTVNATPSAAASGIESAEILQAVPSGEGDAFELTVSCQGGLPKEACMEISSPGCQPPAQR
 LCQPVLPSACQLVLHQILKGGSGTYCLNVSADTNSLAVVSTQLIVPGILLTGQEAGLGQASTVTPT
 ATATPSAIVTTITPTATTKPASPLTFALQLHDPSGYLAEADLSYTWDFGDSSGTLISRALVVTHTYLE
 PGPVTAQVVLQAAIPLTSCGSSPVPAS (SEQ ID NO.:94)*

5

gp100: - Secuencia de Ácidos Nucleicos. Péptido 1 - subrayado, Péptido 2 - letra cursiva, Péptido 3 - letra negrita, Péptido 4 - letra negrita-subrayada, Péptido 5 - letra negrita-cursiva.

GATACAACAGAACCTGCAACACCTACAACACCTGTAACAACACCGACAACAACAAAAGTACCC
AGAAACCAGGACTGGCTTGGTGTCTCAAGGCAACTCAGAACCAAAGCCTGGAACAGGCAGCTG

10

TATCCAGAGTGGACAGAAGCCCAGAGACTTGACTGCTGGAGAGGTGGTCAAGTGCCCTCAAG
GTCAGTAATGATGGGCCTACACTGATTGGTGCAAATGCCTCCTTCTCTATTGCCTTGAACCTCCC
TGGAAGCCAAAAGGTATTGCCAGATGGGCAGGTTATCTGGGTCAACAATACCATCATCAATGG
GAGCCAGGTGTGGGGAGGACAGCCAGTGTATCCCCAGGAACTGACGATGCCTGCATCTTCCCT
GATGGTGGACCTTGCCCATCTGGCTCTTGGTCTCAGAAGAGAAGCTTTGTTTATGTCTGGAAGA
CCTGGGGCCAATACTGGCAAGTTCTAGGGGGCCCAGTGTCTGGGCTGAGCATTGGGACAGGCA
GGGCAATGCTGGGCACACACACCATGGAAGTGACTGTCTACCATCGCCGGGGATCCCAGAGCT
ATGTGCCTCTTGCTCATTCCAGCTCAGCCTTACCATTACTGACCAGGTGCCTTTCTCCGTGAGC
GTGTCCCAGTTGCGGGCCTTGGATGGAGGGAACAAGCACTTCCTGAGAAATCAGGCTAGTACC
AACGGCAGCATCACCGTGGCCGCCACCGCCCCACCGTGACCCCCACCGTGAACGCCACCCCCA
GCGCCGCCGCTAGTGGCACCACAGATGGGCACAGGCCAACTGCAGAGGCCCTAACACCACAGCTG
GCCAAGTGCCTACTACAGAAGTTGTGGTACTACACCTGGTCAGGCGCCAAGTGCAGAGCCCTCTGG
AACCACATCTGTGCAGGTGCCAACCACTGAAGTCATAAGCACTGCACCTGTGCAGATGCCAACTGCAG
AGAGCACAGGTATGACACCTGAGAAGGTGCCAGTTTCAGAGGTCATGGGTACCACACTGGCAGAGAT
GTCAACTCCAGAGGCTACAGGTATGACACCTGCAGAGGTATCAATTGTGGTGCTTTCTGGAACCACAG
CTGCAGCTAGTACCGTGACCCCCACCGCCACCGCCACCCCCAGCGCCATCGTGACCACCATCAC
CCCCACCGCCACCACCAAGCCCGCTAGTGCAGGTAACAACACTACAGAGTGGGTGGAGACCACA
GCTAGAGAGCTACCTATCCCTGAGCCTGAAGGTCCAGATGCCAGCTCAATCATGTCTACG
GAAAGTATTACAGGTTCCCTGGGCCCCCTGCTGGATGGTACAGCCACCTTAAGGCTGGTG
AAGAGACAAGTCCCCCTGGATTGTGTTCTGTATCGATATGGTTCCTTTTCCGTCACCCTGG
ACATTGTCCAGGCTAGTACCAACGGCAGCATCACCGTGGCCGCCACCGCCCCACCGTGACCC
CCACCGTGAACGCCACCCCCAGCGCCGCCGCTAGTGGTATTGAAAGTGCCGAGATCCTGCAG
GCTGTGCCGTCCGGTGAGGGGGATGCATTTGAGCTGACTGTGTCTGCCAAGGCGGGCT
GCCCAAGGAAGCCTGCATGGAGATCTCATCGCCAGGGTGCCAGCCCCCTGCCAGCGGCT
GTGCCAGCCTGTGCTACCCAGCCAGCCTGCCAGCTGGTTCCTGCACCAGATACTGAAGGG
TGGCTCGGGACATACTGCCTCAATGTGTCTCTGGCTGATACCAACAGCCTGGCAGTGGT
CAGCACCAGCTTATCGTGCCCTGGGATTCTTCTCACAGGTCAAGAAGCAGGCCTTGGGCA
GTAAGCTAGTACCGTGACCCCCACCGCCACCGCCACCCCCAGCGCCATCGTGACCACCATCACC
CCCACCGCCACCACCAAGCCCGCTAGTCTCTGACCTTTGCCCTCCAGCTCCATGACCCTAGTGG
CTATCTGGCTGAAGCTGACCTCTCCTACACCTGGGACTTTGGAGACAGTAGTGAACCCTGATCT
CTCGGGCACYTGTGGTCACTATACTTACCTGGAGCCTGGCCAGTCACTGCCAGGTGGTCTCTG
CAGGCTGCCATTCTCTACCTCCTGTGGCTCCTCCCCAGTTCCA GCTAGC TGA (SEQ ID
 NO.:95)

GP100-Péptido 1 - Secuencia de Ácidos Nucleicos.

GATACAACAGAACCTGCAACACCTACAACACCTGTAACAACACCGACAACAACAAAAGTACCC
AGAAACCAGGACTGGCTTGGTGTCTCAAGGCAACTCAGAACCAAAGCCTGGAACAGGCAGCTG
TATCCAGAGTGGACAGAAGCCCAGAGACTTGACTGCTGGAGAGGTGGTCAAGTGTCCCTCAAG
GTCAGTAATGATGGGCCCTACACTGATTGGTGCAAATGCCTCCTTCTCTATTGCCTTGAACCTCCC
TGGAAGCCAAAAGGTATTGCCAGATGGGCAGGTTATCTGGGTCAACAATACCATCATCAATGG
GAGCCAGGTGTGGGGAGGACAGCCAGTGTATCCCCAGGAACTGACGATGCCTGCATCTTCCCT
GATGGTGGACCTTGCCCATCTGGCTCTTGGTCTCAGAAGAGAAGCTTTGTTTTATGTCTGGAAGA
CCTGGGGCCAATACTGGCAAGTTCTAGGGGGCCCAGTGTCTGGGCTGAGCATTGGGACAGGCA
GGGCAATGCTGGGCACACACACCATGGAAGTGACTGTCTACCATCGCCGGGGATCCCAGAGCT
ATGTGCCTCTTGCTCATTCCAGCTCAGCCTTACCATTACTGACCAGGTGCCTTTCTCCGTGAGC
GTGTCCCAGTTGCGGGCCTTGGATGGAGGGAACAAGCACTTCTGAGAAATCAG (SEQ ID
NO.:96)

Secuencia de Proteínas:

DTTEPATPTTPVTTPTTTKVP RNQDWLG VSRQLRTKAWNRQLYPEWTEAQR LDCWRGGQVSLKVS
NDGPTLIGANASFSIALNFP GSQKVL PDGQVIWVNNTIINGSQVWGGQP VYPQETDDACIFPDGGPCP
SGSWSQKRSFVYVWKTWGQY WQVLGGPVSGLSIGTGRAMLGHTHTMEVTVYHRRGSQSYVPLAHS
SSAFTITDQVPFSVSVS QLRALDGGNKHFLRNQ (SEQ ID NO.:97)

5

GP100-Péptido 3

**GGCACACAGATGGGCACAGGCCAACTGCAGAGGCCCTAACACCACAGCTGGCCAAGTGCCT
ACTACAGAAGTTGTGGGTACTACACCTGGTCAGGCGCCAACCTGCAGAGCCCTCTGGAACCACAT
CTGTGCAGGTGCCAACCACTGAAGTCATAAGCACTGCACCTGTGCAGATGCCAACTGCAGAGA
GCACAGGTATGACACCTGAGAAGGTGCCAGTTTCAGAGGTCATGGGTACCACACTGGCAGAGA
TGTCAACTCCAGAGGCTACAGGTATGACACCTGCAGAGGTATCAATTGTGGTGCTTTCTGGAAC
CACAGCTGCA (SEQ ID NO.:98)**

10

Secuencia de Proteínas:

**GTTDGH RPTAEAPNTTAGQVPTTEVVGTTPGQAPTAEPSGTT SVQVPTTEVISTAPVQMPTAESTGM
TPEKVPVSEVMGTTLAEMSTPEATGMTPAEVSIVVLSGTTAA (SEQ ID NO.:99)**

15 GP100-Péptido 4:

CAGGTAACA ACTACAGAGTGGGTGGAGACCACAGCTAGAGAGCTACCTATCCCTGAGCCTGAA
GGTCCAGATGCCAGCTCAATCATGTCTACGGAAAGTATTACAGGTTCCCTGGGCCCCCTGCTGG
ATGGTACAGCCACCTTAAGGCTGGTGAAGAGACAAGTCCCCCTGGATTGTGTTCTGTATCGATA
TGGTTCCTTTTCCGTCACCCTGGACATTGTCCAG (SEQ ID NO.:100)

Secuencia de Proteínas:

**QVTTEWVETTARELPIPEPEGPDASSIMSTESITGSLGPLLDGTATLRLVKRQVPLDCVLYRYGSFSV
TLDIVQ (SEQ ID NO.:101)**

GP100-Péptido 5

**GGTATTGAAAGTGCCGAGATCCTGCAGGCTGTGCCGTCCGGTGAGGGGGATGCATTTGAGCTGA
CTGTGTCTGCAAGGCGGGCTGCCAAGGAAGCCTGCATGGAGATCTCATCGCCAGGGTGCCA
GCCCCCTGCCAGCGGCTGTGCCAGCCTGTGCTACCCAGCCCAGCCTGCCAGCTGGTTCTGCAC
CAGATACTGAAGGGTGGCTCGGGGACATACTGCCTCAATGTGTCTCTGGCTGATACCAACAGCC
TGGCAGTGGTCAGCACCCAGCTTATCGTGCCTGGGATTCTTCTCACAGGTCAAGAAGCAGGCCT
TGGGCAG (SEQ ID NO.:102)**

5

Secuencia de Proteínas:

**GIESAEILQAVPSGEGDAFELTVSCQGGPLKEACMEISSPGCQPPAQRLCQPVLPSPACQLVLHQILK
GGSGTYCLNVSLADTNSLAVVSTQLIVPGILLTGQEAGLGQ (SEQ ID NO.:103)**

10

GP100-Péptido 2

**CCTCTGACCTTTGCCCTCCAGCTCCATGACCCTAGTGGCTATCTGGCTGAAGCTGACCTCTCCTA
CACCTGGGACTTTGGAGACAGTAGTGAACCCTGATCTCTCGGGCACYTGTGGTCACTCATACT
TACCTGGAGCCTGGCCCAGTCACTGCCAGGTGGTCTGCAGGCTGCCATTCTCTCACCTCCTG
TGGCTCCTCCCCAGTCCAGCTAGC (SEQ ID NO.:104)**

15

Secuencia de Proteínas:

**PLTFALQLHDPSGYLAEADLSYTWDFGDSSGTLISRAXVVTHTYLEPGPVTAQVVLQAAIPLTSCGS
SPVPAS (SEQ ID NO.:105)**

20

Antígeno de Ciclina B 1. La Ciclina B 1, también conocida como CCNB 1, es un gen humano que codifica una proteína reguladora implicada en la mitosis. Complejos de Ciclina B 1 con p34(cdc2) para formar el factor de promotor de la maduración (MPF). Se conocen dos transcripciones alternativas que son el resultado de sitios alternativos de inicio de la transcripción. Una primera transcripción codifica una transcripción expresada de forma constitutiva. La segunda transcripción es una transcripción regulada por el ciclo celular expresaba predominantemente durante la fase G2/M.

25

La siguiente secuencia de aminoácidos es de ciclina B1 humana. Dos regiones de péptidos conocidas porque contienen epítipo de linfocitos T están resaltadas en letra negra-subrayada y en letra cursiva-subrayada.

**MALRVTRNSKINAENKAKINMAGAKRVPTAPAATSKPGLRPRALGDIGNKVSEQLQAKMPMKKE
AKPSATGKVIDKKLPKPLEKVPMLVPVPVSEPVPEPEPEPEPEVKEEKLSPILVDTASPSMETSG
CAPAEEDLCQAFSDVILAVNDVDAEDGADPNLCSEYVKDIYAYLRQLEEEQAVRPKYLLGREVTGN
MRAILLDWLVQVQMKFRLQETMYMTVSHDRFMQNNCVPKKMLQLVGVTAMFIASKYEEMYP
PEIGDFAFVTDNTYTKHQIRQMEMKILRALNFGLGRPLPLHFLRRASKIGEVDVEOHTLAKYLMET
MLDYDMVHFPPSQIAAGAFCLALKILDNGEWTPTLQHLYSYTEESLLPVMQHLAKNVVMVNQGLT
KHMTVKNKYATSKHAKISTLPQLNSALVQDLAKAVAKVHHHHHH (SEQ ID NO.:106)**

Péptido-1 MEMKILRALNFGLGRPLPLHFLRRASKIGEVDVEQHTLAKYLMELTMLDY (SEQ ID NO: 107)

Péptido-2 DWLVQVQMKFRLQETMYMTVSIIDRFMQNNCVPKK (SEQ ID NO: 108).

La Fig. 35 muestra un resumen de niveles de expresión relativa de prototipo de vacunas de Ciclina B1 secretadas a partir de células 293F de mamífero transfectadas. Las secuencias conectoras flexibles facilitan la secreción.

5 C1189 rAB-cetHS-puro[manti-CD40_12E12.3F3_H-LV-hlgG4H-C-Flex-v1 (letra negrita)-hCiclinaB1-Péptido-2(letra cursiva)-Péptido-1 (letra negrita-cursiva)-f4 (letra negrita)] [conectores de AS - subrayados]

EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSYYMYWVRQTPEKRLEWVAYINSGGGSTYYPDTVK
 GRFTISRDNANTLYLQMSRLKSEDTAMYYCARRGLPFHAMDYWGQGTSVTVSSAKTKGPSVFPL
 APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTK
 TYTCNVVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
 SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKASQTPTNTISVTPTNNST
PTNNSNPKNPASDWLVQVQMKFRLQETMYMTVSIIDRFMQNNCVPKKASMEMKILRALNFGGRPL
 PLHFLRRASKIGEVDVEQHTLAKYLMELTMLDYASTNDSITVAATAPTPTVTVNATPSAAAS (SEQ
 ID NO.:109)

10 Arriba se encuentra la secuencia de la cadena Pesada secretada madura para una forma de la vacuna anti-CD4012E12-ciclina B1. Los restos de AS son de sitios de restricción de unión. La secuencia de codificación de ADN se muestra a continuación, y ésta incluye el péptido señal.

ES 2 807 232 T3

ATGAACTTGGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCTTGTTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGAA
GCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCCCGAGGGTCCCTGAAACTCTCTGTGCAACC
TCTGGATTCACTTTTCACTGACTATTACATGTATTGGGTTTCGCCAGACTCCAGAGAAGAGGCTGG
AGTGGGTTCGCATACATTAATTCTGGTGGTGGTAGCACCTATTATCCAGACACTGTAAAGGGCCG
ATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCCGGCTGAAGTCT
GAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGACGGGGGTTACCGTTCATGCTATGGACTATTGGG
GTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGC
GCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC
CCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGG
CTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTG
GGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA
GTTGAGTCCAAATATGGTCCCCATGCCACCCTGCCAGCACCTGAGTTCGAAGGGGGACCAT
CAGTCTTCTGTTCCCCCAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTAC
GTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGG
CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGT
GGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGT
CTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
AGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCT
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA
GCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCCTCCCGTGGTACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTAC
AGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAAGCTAGTC
AGACCCCAACCAACACCATCAGCGTGACCCCAACCAACAACAGCACCCCAACCAACAACAGCA
ACCCCAAGCCCAACCCCGCTAGTACTGGCTAGTACAGGTTCAAATGAAATTCAGGTTGTTGCA
GGAGACCATGTACATGACTGTCTCCATTATTGATCGGTTTCATGCAGAATAATTGTGTGCCCAAG
AAGGCTAGTATGGAATGAAGATTCTAAGAGCTTTAAACTTTGGTCTGGGTCCGGCCTCTACCTT
TGCACTTCTTCCGGAGAGCATCTAAGATTGGAGAGGTTGATGTCGAGCAACATACTTTGGCCAA
ATACCTGATGGAACATACTATGTTGGACTATGCTAGTACCAACGACAGCATCACCGTGGCCGCC
ACCGCCCCACCGTGACCCCAACCGTGAACGCCACCCCAAGCGCCCGCTAGCTGA (SEQ ID
NO.:110)

C1143 rAB-cetHS-puro[manti-CD40_12E12.3F3_H-LV-hlgG4H-C-Flex-v1 (letra **negrita**)-hCiclinaB1-Péptido-2(letra *cursiva*)-f3 (letra **negrita**)] [conectores de AS - subrayados].

5

ES 2 807 232 T3

EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLEWVAYINSGGGSTYYPDVTK
GRFTISRDNANTLYLQMSRLKSEDTAMYYCARRGLPFHAMDYWGQTSVTVSSAKTKGPSVFPPL
APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTK
TYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKASQTPNTISVTPTNST
PTNNSNPKNPASDWL^VQVQMKFLLQETMYMTVSIIDRFMQNNCVPKKASTVTPTATATPSAIVTTI
TPTATTKPAS (SEQ ID NO.:111)

5 Arriba se encuentra la secuencia de la cadena Pesada secretada madura para una forma de la vacuna anti-CD4012E12-ciclina B1. Los restos de AS son de sitios de restricción de unión. La secuencia de codificación de ADN se muestra a continuación, y ésta incluye el péptido señal.

**ATGAACTTGGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCTTGTTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGAA
GCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCCGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAACC
TCTGGATTCACTTTCAGTGACTATTACATGTATTGGGTTCCGCCAGACTCCAGAGAAGAGGCTGG**

AGTGGGTCGCATACATTAATTCTGGTGGTGGTAGCACCTATTATCCAGACACTGTAAAGGGCCG
 ATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCCGGCTGAAGTCT
 GAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGACGGGGTTACCGTTCCATGCTATGGACTATTGGG
 GTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGAAGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGC
 GCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC
 CCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGG
 CTGTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCCTGCCCTCCAGCAGCTTG
 GGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA
 GTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCCTGCCAGCACCTGAGTTCTGAAGGGGGACCAT
 CAGTCTTCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC
 GTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGG
 CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGT
 GGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT
 CTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
 AGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCCT
 GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA
 GCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTAC
 AGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
 CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAAGCTAGTC
 AGACCCCCACCAACACCATCAGCGTGACCCCCACCAACAACAGCACCCCCACCAACAACAGCA
 ACCCCAAGCCCAACCCCGTAGTGACTGGCTAGTACAGGTTCAAATGAAATTCAGGTTGTTGCA
 GGAGACCATGTACATGACTGTCTCCATTATTGATCGGTTTCATGCAGAATAATTGTGTGCCAAG
 AAGGCTAGTACCGTGACCCCCACCGCCACCGCCACCCCCAGCGCCATCGTGACCACCATCACCC
 CCACCGCCACCACCAAGCCCGTAGCTGA (SEQ ID NO.:112)

C911 rAB-cetHS-puro[manti-CD40_12E12.3F3_H-LV-hlgG4H-C-Flex-v1 (letra negra)-hCiclinaB1-Péptido-1 (letra cursiva)-f4 (letra negra)]

5 EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSYYMYWVRQTPEKRLEWVAYINSGGGSTYYPDVTK
 GRFTISRDNANTLYLQMSRLKSEDTAMYICARRGLPFHAMDYWGQGSVTVSSAKTKGPSVFPL
 APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGK
 TYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
 SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKASQTPTNTISVPTPNST
PTNNSNPKNPASMEMKILRALNFGLRPLPLHFLRRASKIGEVDVEQHTLAKYLMELTMLDYASTNGS
ITVAATAPTPTVNATPSAAAS (SEQ ID NO.:114)

Secuencia de ácidos nucleicos de C911 rAB-cetHS-puro[manti-CD40_12E12.3F3_H-LV-hlgG4H-C-Flex-v1 (letra negra)-hCiclinaB1-Péptido-1 (letra cursiva)-f4 (letra negra)].

10

ATGAACTTGGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGCCTTGTTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGAA
 GCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCCGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAACC
 TCTGGATTCACTTTCAGTGACTATTACATGTATTGGGTTCCGACACTCCAGAGAAGAGGCTGG
 AGTGGGTGCATACATTAATTCTGGTGGTGGTAGCACCTATTATCCAGACACTGTAAAGGGCCG
 ATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCCGGCTGAAGTCT
 GAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGACGGGGGTTACCGTTCATGCTATGGACTATTGGG
 GTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGC
 GCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC
 CCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGG
 CTGTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG
 GGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA
 GTTGAGTCCAAATATGGTCCCCATGCCACCCTGCCAGCACCTGAGTTCGAAGGGGGACCAT
 CAGTCTTCTGTTCCCCCAAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTAC
 GTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGG
 CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGT
 GGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGT
 CTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCG
 AGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCT
 GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA
 GCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTAC
 AGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
 CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAAGCTAGTC
 AGACCCCAACCAACACCATCAGCGTGACCCCAACCAACAGCACCCCAACCAACAGCA
 ACCCAAGCCCAACCCCGTAGTATGGAAATGAAGATTCTAAGAGCTTTAAACTTTGGTCTGGG
 TCGGCCTCTACCTTTGCACTTCCTTCGGAGAGCATCTAAGATTGGAGAGGTTGATGTCGAGCAA
 CATACTTTGGCCAAATACCTGATGGAACACTAATGTTGGACTATGCTAGTACCAACGGCAGCA
 TCACCGTGGCCGCCACCGCCCCACCGTGACCCCAACCGTGAACGCCACCCCAAGCGCCGCCGC
 TAGCTGA (SEQ ID NO.:115)

Antígeno de Ciclina de tipo D. Las ciclinas de tipo D se expresan de forma predominante en la fase G1 del ciclo celular. El patrón de supresión de ciclina D1 se ha estudiado ampliamente en ciertos tipos de cáncer incluyendo linfoma y

5 cáncer de pulmón de células no microcíticas. Aproximadamente un 30 por ciento de carcinomas de mama son positivos para Ciclina D1. La sobreexpresión de la Ciclina D1 es ahora un criterio bien establecido para el diagnóstico de Linfoma de Células del Manto, un linfoma no Hodgkin, maligno, que se caracteriza por una translocación cromosómica única, t(11;14).

10 Ciclina D1 - Péptido 1 - letra negra, Péptido 2 - letra negra-subrayada, Péptido - 3 letra cursiva, Péptido 4 - subrayado.

MEHQLLCCEVETIRRAYPDANLLNDRVLRAMLKAEETCAPSVSYFKCVQKEVLPSMRKIVAT
WMLEVCEEQKCEEEVFPLAMNYLDRFLSLEPVKKSRLQLLGATCMFVASKMKETIPLTAEKL
CIYTDNSIRPEELLQMELLLVNKLKWNLAAMTPHDFIEHFLSKMPEAEENKQIIRKHAQTFVALCATDV
KFISNPPSMVAAGSVVAAVQGLNLRSPNNFLSYRYLTRFLSRVIKCDPDCLRACQEIEALLESSLRQ
AQQNMDPKAAEEEEEEEEEEVDLACTPTDVRDVDI (SEQ ID NO.:116)

Pep-1
 MEHQLLCCEVETIRRAYPDANLLNDRVLRAMLKAEETCAPSVSYFKCV (SEQ ID NO: 117)
 5 Pep-2

QKEVLPSMRKJVATWMLEVCEEQKCEEEVFPLAMNYLDRFLSLEPVKKSRLQLLGATCMFVASKM
 KETIPLTAEKL CIYTDNSIRPEELLQMELL (SEQ ID NO: 118)

10 Pep-3
 LVNKLKWNLAAMTPHDFIEHFLSKMPEAEENKQIIRKHAQTFVALCATDV KFISNPPSMV (SEQ ID NO: 119)
 Pep-4

AAGSVVAAVQGLNLRSPNNFLSYRYLTRFLSRVIKCDPDCLRACQEIEALLESSLRQAQQNMDPK
 AAEEEEEEEEEEVDLACTPTDVRDVDI (SEQ ID NO.:120)

15

Tabla 1. Correlación de Clon-Anticuerpo

Nombre	Clon	Isotipo
PAB176 PAB176	AB13_22.11B6.2C6 AB13.22.11B6.1C3 (HS440) - subclon	IgG1k
PAB177	<u>AB13_22.11C7.1D6</u>	IgG2b k
PAB180	<u>AB13_22.11H12.1G1</u>	IgG1k
PAB188 PAB1574	<u>AB13_22.12B4.2C10</u>	IgG1k
PAB187 PAB366 PAB525 PAB530 PAB594 PAB1400 PAB1700	<u>AB13_22.12E12.3F3</u>	IgG1k
PAB184	AB13_22.15C11.3G12	IgG1k
PAB 181	<u>AB13_22.19B5.4C11</u>	IgG2a k
PAB183	AB13_22.24A33F1	IgG2b k
PAB178	<u>AB13_22.24C9.2A6</u>	IgG2b k
PAB 189	<u>AB13_22.2G2.1A5</u>	IgG2b k
PAB194	<u>AB13_22.3C7.1G5</u>	IgG2a k
PAB1573		
PAB193	<u>AB13_22.7G10.2D5</u>	IgG2a k
PAB1572		
PAB 182 PAB1435	<u>AB13_22.8A4.3G10</u>	IgG1k
PAB 179	<u>AB13_22.8F6.2C7</u>	IgG2b k
PAB190	<u>AB13_22.9A11.2A11</u>	IgG1 lam

- La Fig. 34 muestra los resultados obtenidos con los diversos anticuerpos usando un ensayo que detectan la señalización a través de ligación de CD40 – lectura como muerte celular. El propio CD40 puede enviar señales de este tipo, pero el dominio intracelular de FAS se usa para comparación cuando se expresan células CHO (Fas CHO con respecto a CHO). En resumen, las células CHS-S se transfectaron con vectores de expresión para cualquier hCD40ectodominioTM fusionado con el dominio intracelular de FAS, o hCD40. Estas células proliferan de forma normal, pero con señalización a través de señales apoptóticas activadas por ligación de CD40. Después de 48 horas, MTT se añade al cultivo y se mide la reducción en colorante, que es directamente proporcional al contenido de mitocondrias activas (es decir, células vivas).
- 5
- 10 ELISA. Las placas se revistieron con cualquiera de CD40 ecto (humano o NHP coh) y a continuación con los mAb. anti-mIgG HRP o CBD doc/a continuación CD40 ecto (coh = cohesina, NHP = primate no humano, HRP = peroxidasa de rábano picante) a continuación los mAb y a continuación HRP anti-mIgG o Captura es anti-mIgG a continuación CD40 ecto biotinilado con los Mab (humano o NHP coh). La producción de citoquinas se midió como se ha descrito en los ejemplos mencionados anteriormente.
- 15
- La Fig. 35 muestra la unión de diversas construcciones cuando el anticuerpo se ha preparado en una proteína de fusión con doc y a continuación capturas. Las Figs. 36 y 37 comparan la producción de citoquinas con o sin la adición de GM-CSF e IFN α (Fig. 36 A-D), y anticuerpos solubles son los (Fig. 37A-D) incubados con las DC durante 24 horas. La Figura 38A-B demuestra el efecto de diversas concentraciones de anticuerpos anti-CD40 de la presente invención en la proliferación directa de linfocitos B.
- 20
- Proliferación de linfocitos B. Los linfocitos B de PBMC de donantes sanos se enriquecieron con el kit de enriquecimiento de linfocitos B (de BD). 5 x 10⁴ linfocitos B etiquetados con CFSE se cultivaron en medio RPMI que contenía FCS al 10 % en presencia de 50 unidades/ml de IL-2 durante 6 días. La proliferación de linfocitos B se sometió a ensayo midiendo la dilución de CFSE usando citometría de flujo. De forma sorprendente, se encontró que algunos anticuerpos eran capaces de causar la proliferación de los linfocitos B a diversas diluciones, mientras que un control de inmunoglobulina y un anticuerpo anti-CD40 (los datos no se muestran) no lo hacían.
- 25
- Las diversas construcciones mostradas en el presente documento demuestran que los anticuerpos CD40 (por ejemplo, 12E12) son capaces de una activación fuerte como dominios variables cuando: (1) el anticuerpo se vuelve a configurar como una quimera de región v de ratón recombinante y región C de IgG4 humana, y (2) la actividad se puede retener en el contexto de (1) con cadena H - antígeno C-terminal añadido. Estas proteínas de fusión de región variable-péptido y/o complejos aumenta en gran medida la eficacia de la vacuna.
- 30
- Se contempla que cualquier realización discutida en la presente memoria descriptiva se puede poner en práctica con respecto a cualquier método, kit, reactivo o composición de la invención, y viceversa. Además, las composiciones de la invención se pueden usar para conseguir métodos de la invención.
- 35
- Se entenderá que las realizaciones en particular descritas en el presente documento se muestran a modo de ilustración y no como limitaciones de la invención. Las principales características de la presente invención se pueden usar en diversas realizaciones sin apartarse del alcance de la invención. Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de discernir el uso de no más que experimentación de rutina, números equivalentes a los procedimientos específicos descritos en el presente documento. Tales equivalentes se consideran dentro del alcance de la presente invención y están cubiertos con las reivindicaciones.
- 40
- 45
- Todas las publicaciones y solicitudes de patentes mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de experiencia de los expertos en la materia a la que pertenece la presente invención.
- 50
- El uso del término "un" o "uno" cuando se usa en conjunto con la expresión "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva pueden hacer referencia a "uno", pero también es coherente con el significado de "uno o más", "al menos uno", y "uno o más de uno". El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para hacer referencia a "y/o" a menos que se indique de forma explícita que hace referencia solamente a alternativas o las alternativas son mutuamente exclusivas, aunque la divulgación apoye una definición que se refiere solamente a alternativas e "y/o". A través de la presente solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la variación de error inherente para el dispositivo, siendo usado el método para determinar el valor, o la variación que existe entre los objetos de estudio.
- 55
- 60
- Como se usa en la presente memoria descriptiva y en la reivindicación(s), las expresiones "que comprende" (y cualquier forma de que comprende, tal como "comprender" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de que tiene, tal como "tener" y "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de que incluye, tal como "incluye" e "incluir") o "que contiene" (y cualquier forma de que contiene, tal como "contiene" y "contener") son inclusivas e indefinidas y por lo tanto no excluyen elementos o etapas del método sin mencionar, adicionales.
- 65
- La expresión "o combinaciones de los mismos", como se usa en el presente documento, se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los elementos enumerados que preceden a la expresión. Por ejemplo, "A, B, C, o combinaciones de los mismos" pretende incluir al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC, o ABC, si el orden es importante

5 en un contexto en particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC, o CAB. Continuando con este ejemplo, están incluidas de forma expresa combinaciones que contienen repeticiones de uno o más elementos o términos, tales como BB, AAA, MB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, y así sucesivamente. El experto en la materia entenderá que por lo general no hay límite en el número de elementos o términos en cualquier combinación, a menos que sea evidente de otro modo a partir del contexto.

Todas las composiciones y/o métodos desvelados y reivindicados en el presente documento se pueden preparar y ejecutar sin experimentación excesiva a la vista de la presente divulgación.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo recombinante o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a CD40, en el que el anticuerpo:
- 5 (a) comprende una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 4 o 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3;
(b) comprende una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 7 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6; o
10 (c) es una versión humanizada de (a) o (b).
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente:
- 15 una región constante de cadena pesada, en el que la región constante de cadena pesada comprende una región constante de cadena pesada humana gamma-1, gamma-2, gamma-3, o gamma-4 o una variante de la región constante de cadena pesada humana; y
una región constante de cadena ligera, en el que la región constante de cadena ligera comprende una región constante de cadena ligera humana lambda o kappa.
- 20 3. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el fragmento de unión se selecciona entre el grupo que consiste en Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂, y un diacuerpo.
4. Una composición que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en la que el anticuerpo es el anticuerpo de la reivindicación 1.
- 25 5. Un método para preparar un anticuerpo que comprende: expresar, en una célula hospedadora, un anticuerpo recombinante o un fragmento de unión a antígeno del mismo, ambos de los cuales se unen a CD40, en el que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo:
- 30 (a) comprende una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 4 o 5 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3;
(b) comprende una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 7 y una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 6; o
35 (c) es una versión humanizada de (a) o (b).
6. El método de la reivindicación 5, en el que el anticuerpo solo es capaz de hacer que las células dendríticas secreten al menos uno de IL-6, MIP-1a, IL-12p40 o TNFalfa sin activación previa de las células dendríticas.
- 40 7. El método de la reivindicación 5, en el que el anticuerpo es capaz de hacer que las células dendríticas activadas con GM-CSF e Interferón alfa secreten al menos uno de IL-6, MIP-1a, IP-10, IL-10 o IL-12p40.
8. Un anticuerpo recombinante humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo solo es capaz de causar la proliferación de linfocitos B de al menos un 10 % de los linfocitos B.
- 45 9. El anticuerpo de la reivindicación 8, en el que el porcentaje de linfocitos B que proliferan es al menos un 15 %, 20 %, 25 %, 28 %, 30 % o un 35 %.

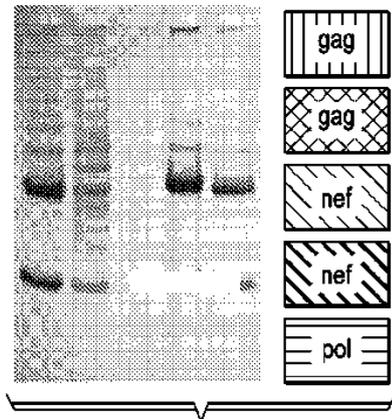


FIG. 1

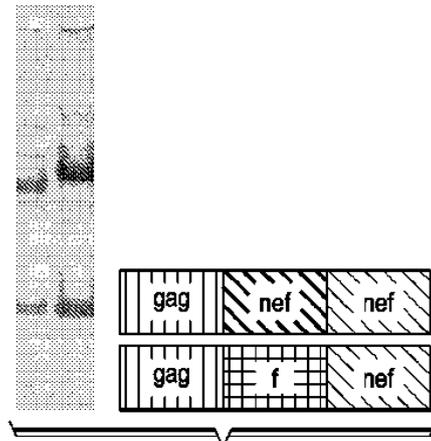


FIG. 2

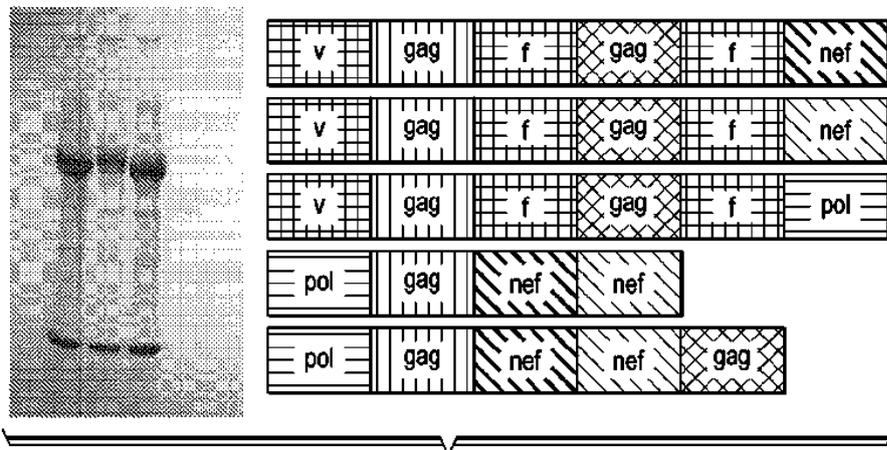


FIG. 3

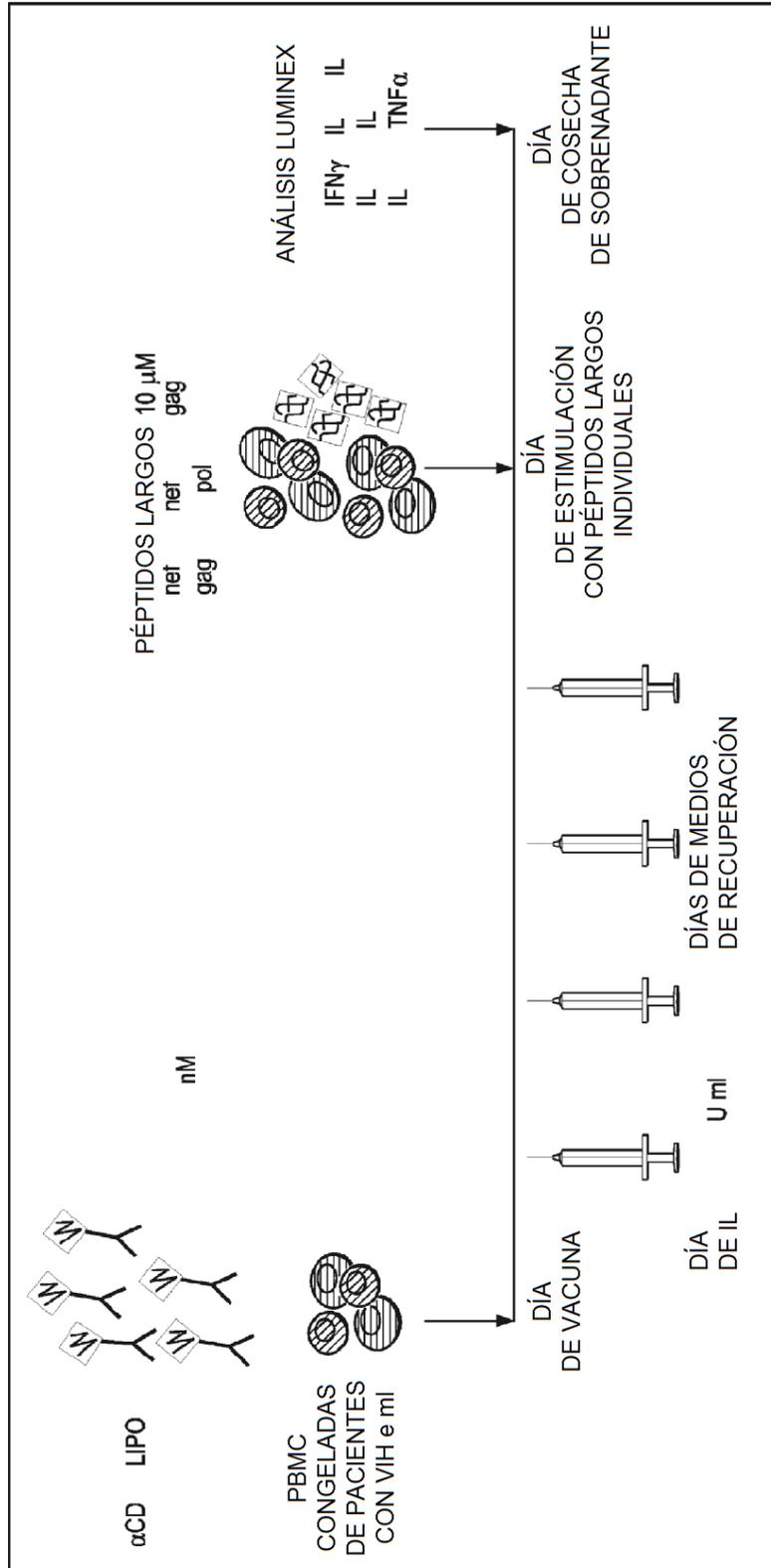
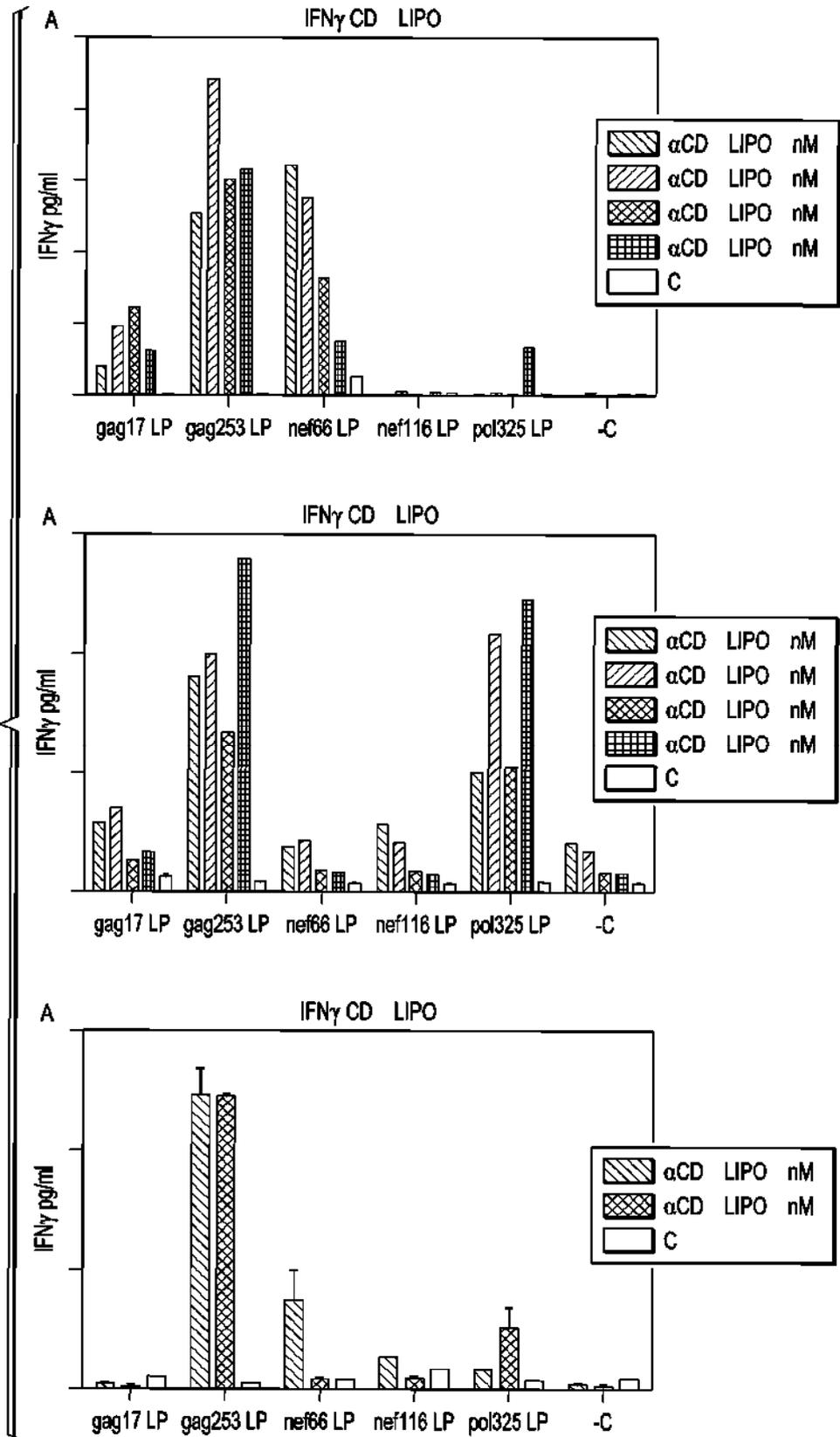
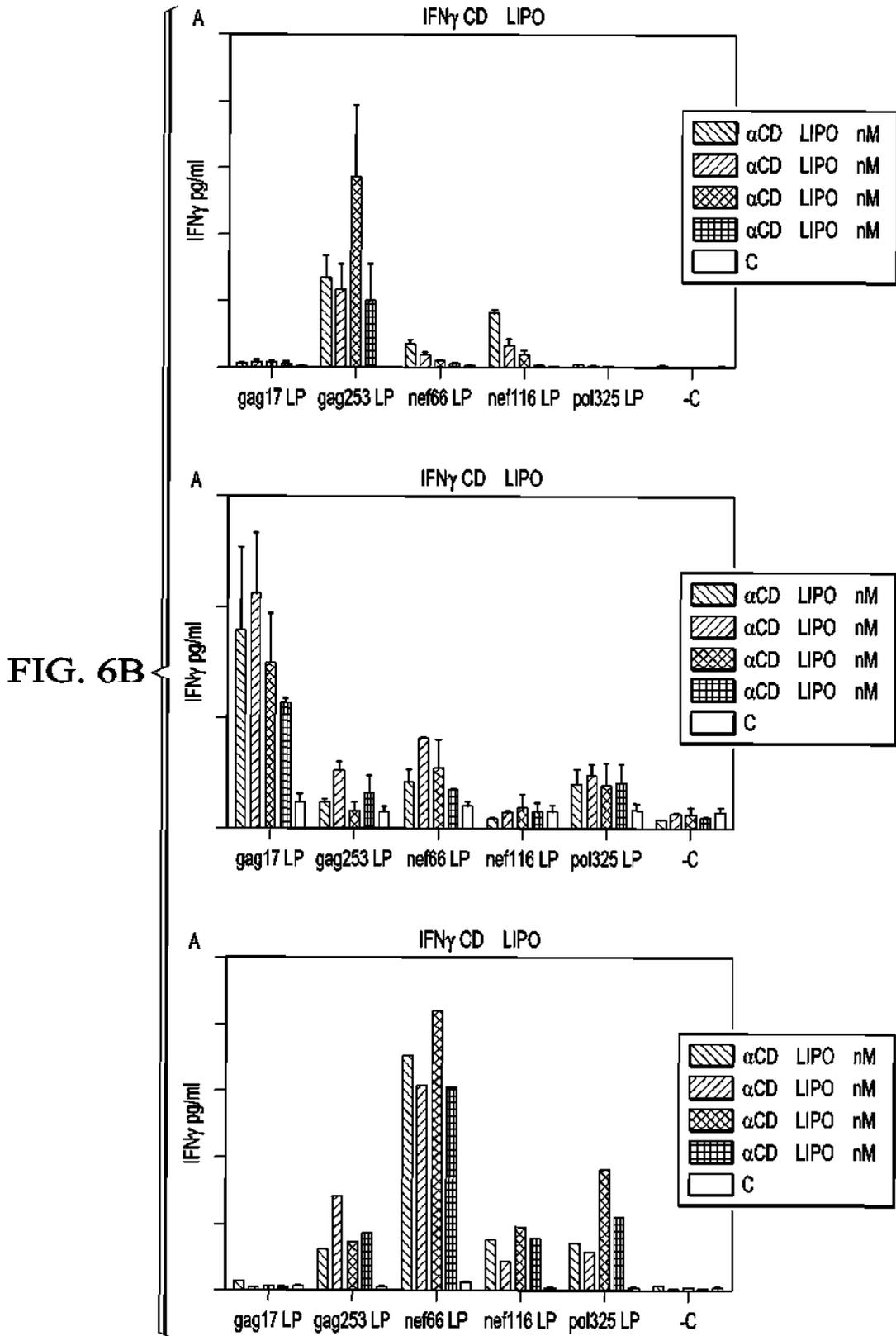
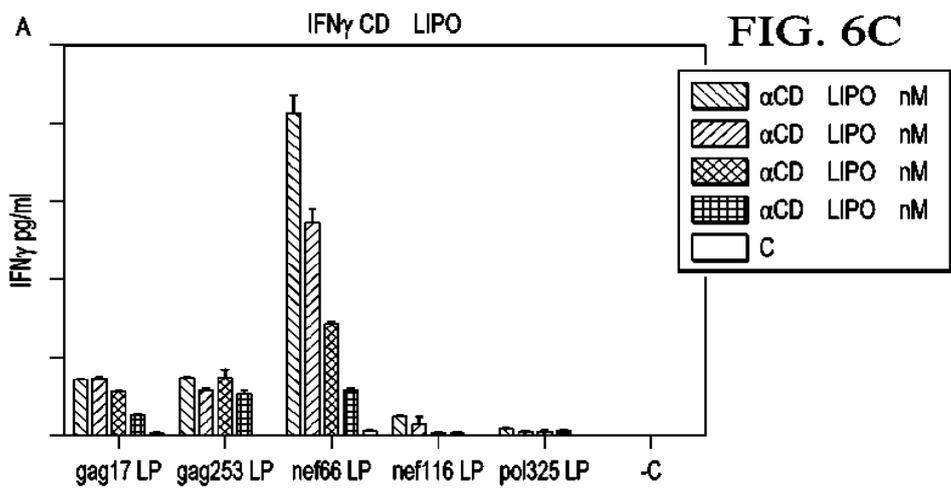


FIG. 5

FIG. 6A







	Gag	Gag	Nef	Nef	Pol
A	RESPUESTA DÉBIL	RESPUESTA FUERTE	RESPUESTA FUERTE	SIN RESPUESTA	SIN RESPUESTA
A	SIN RESPUESTA	RESPUESTA FUERTE	SIN RESPUESTA	SIN RESPUESTA	RESPUESTA FUERTE
A	SIN RESPUESTA	RESPUESTA FUERTE	SIN RESPUESTA	SIN RESPUESTA	RESPUESTA DÉBIL
A	SIN RESPUESTA	RESPUESTA FUERTE	SIN RESPUESTA	SIN RESPUESTA	SIN RESPUESTA
A	RESPUESTA FUERTE	SIN RESPUESTA	RESPUESTA DÉBIL	SIN RESPUESTA	RESPUESTA DÉBIL
A	SIN RESPUESTA	RESPUESTA DÉBIL	RESPUESTA FUERTE	RESPUESTA DÉBIL	RESPUESTA DÉBIL
A	SIN RESPUESTA	RESPUESTA FUERTE	SIN RESPUESTA	SIN RESPUESTA	SIN RESPUESTA
A	RESPUESTA DÉBIL	RESPUESTA DÉBIL	RESPUESTA FUERTE	SIN RESPUESTA	SIN RESPUESTA

 RESPUESTA FUERTE

 RESPUESTA MEDIA

 RESPUESTA DÉBIL

 SIN RESPUESTA

FIG. 7

FIG. 8A

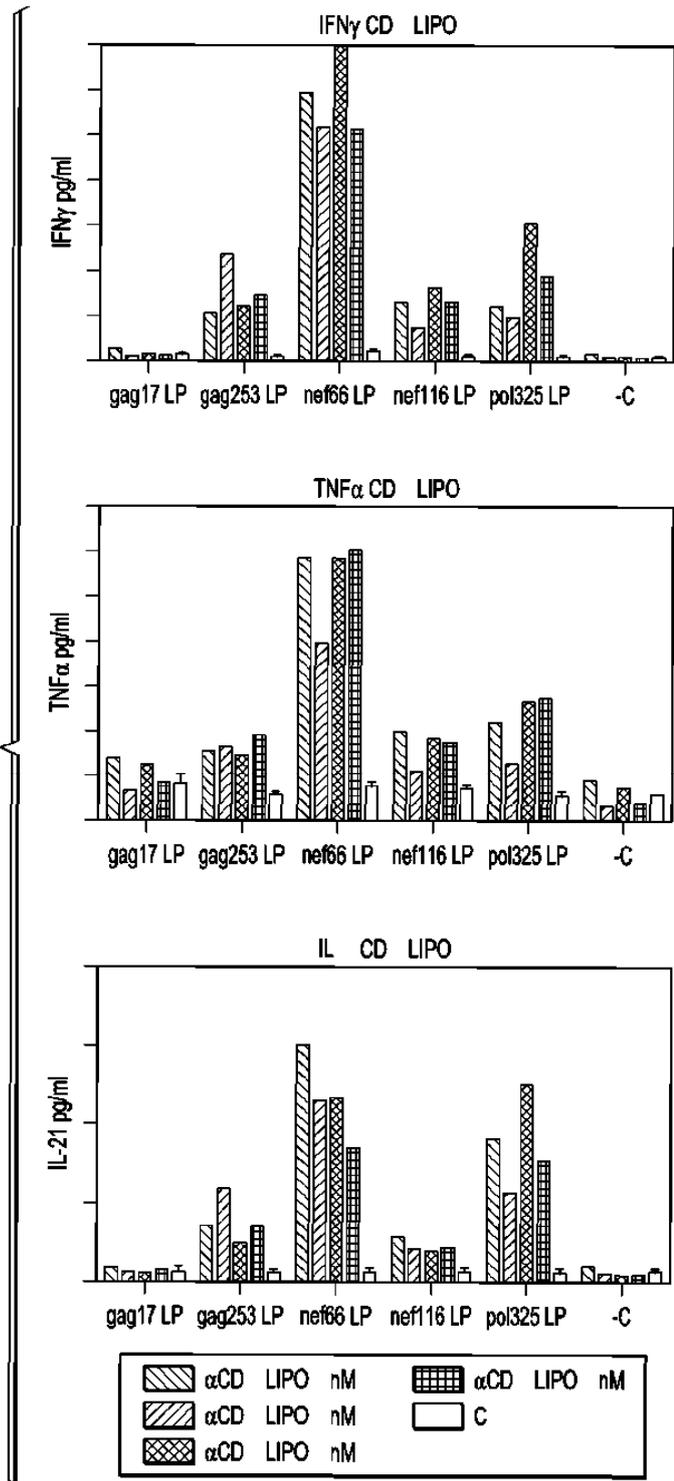
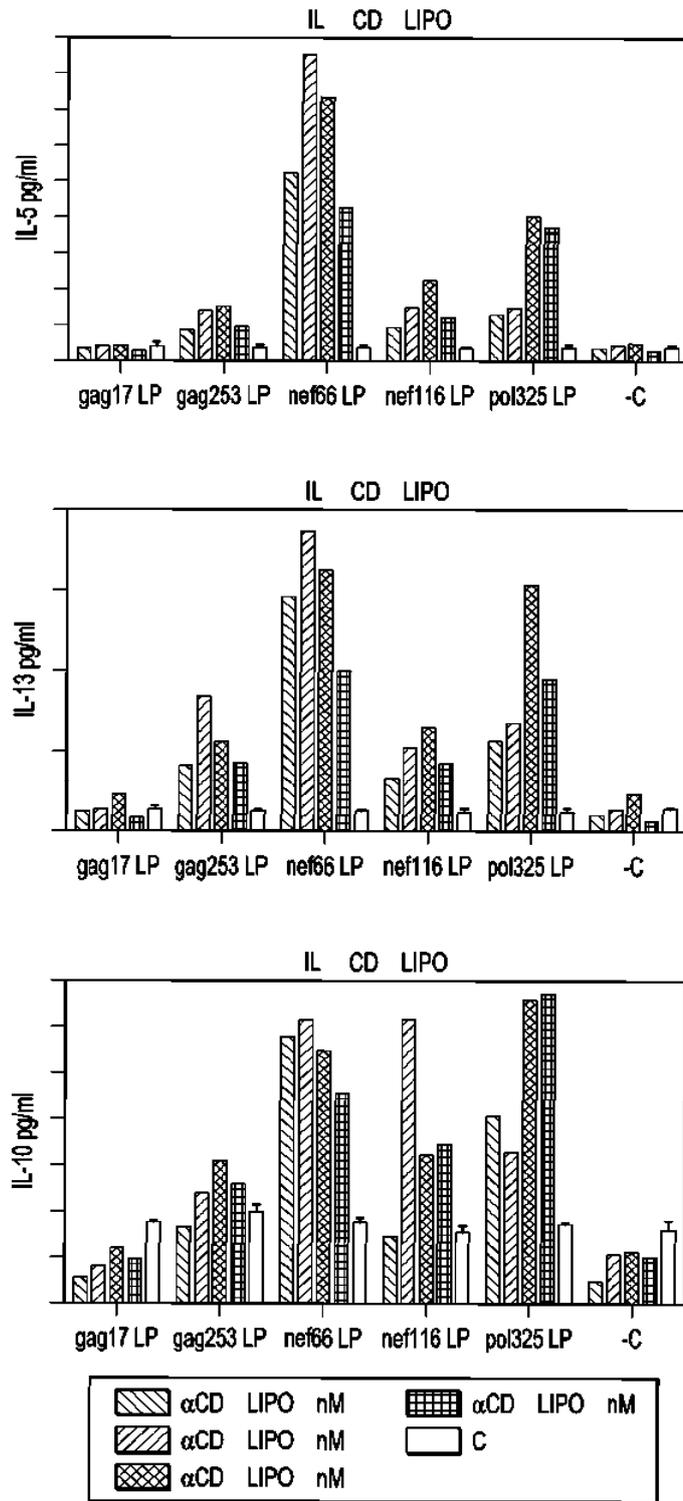


FIG. 8B



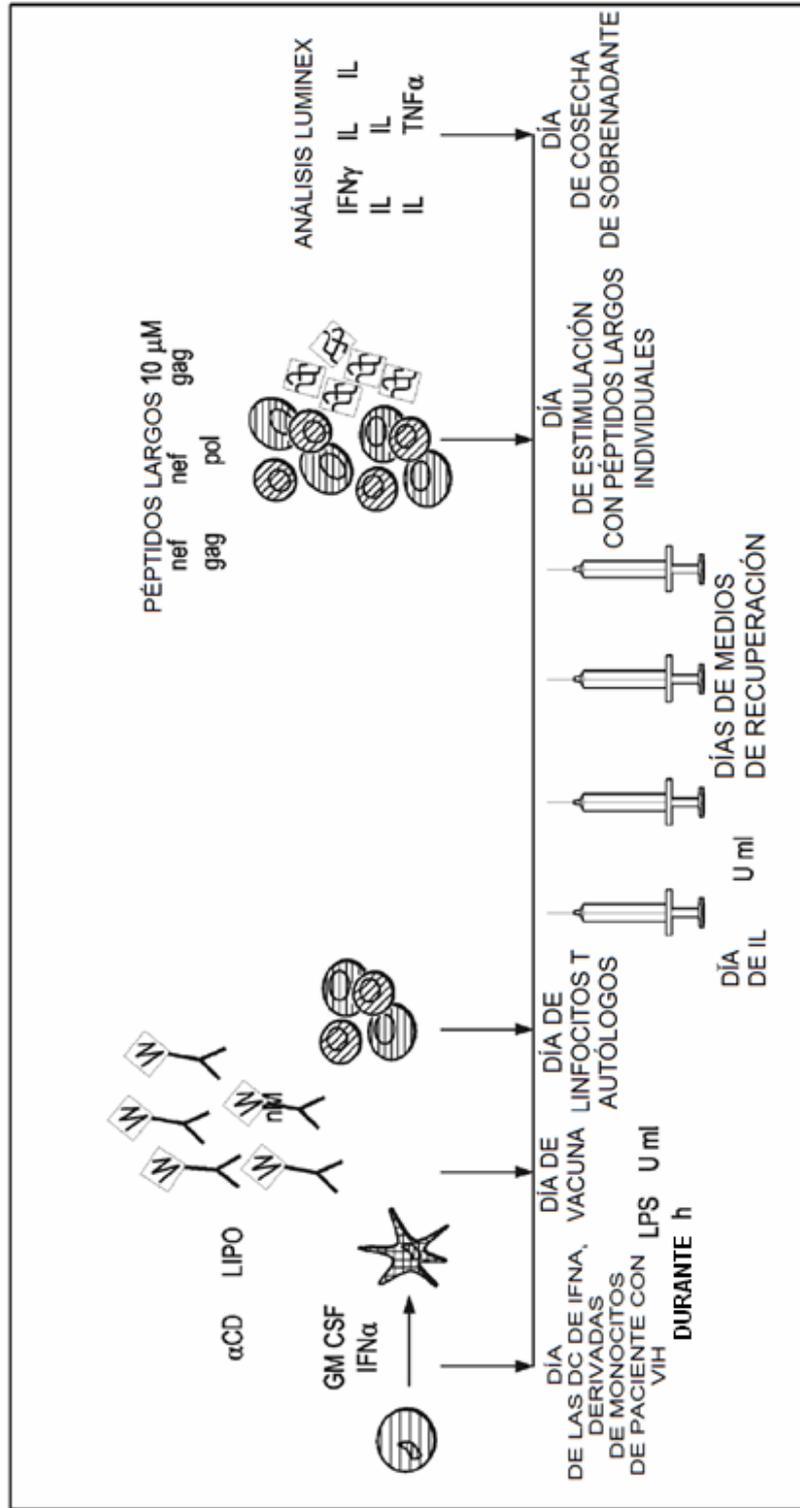


FIG. 9

FIG. 10A

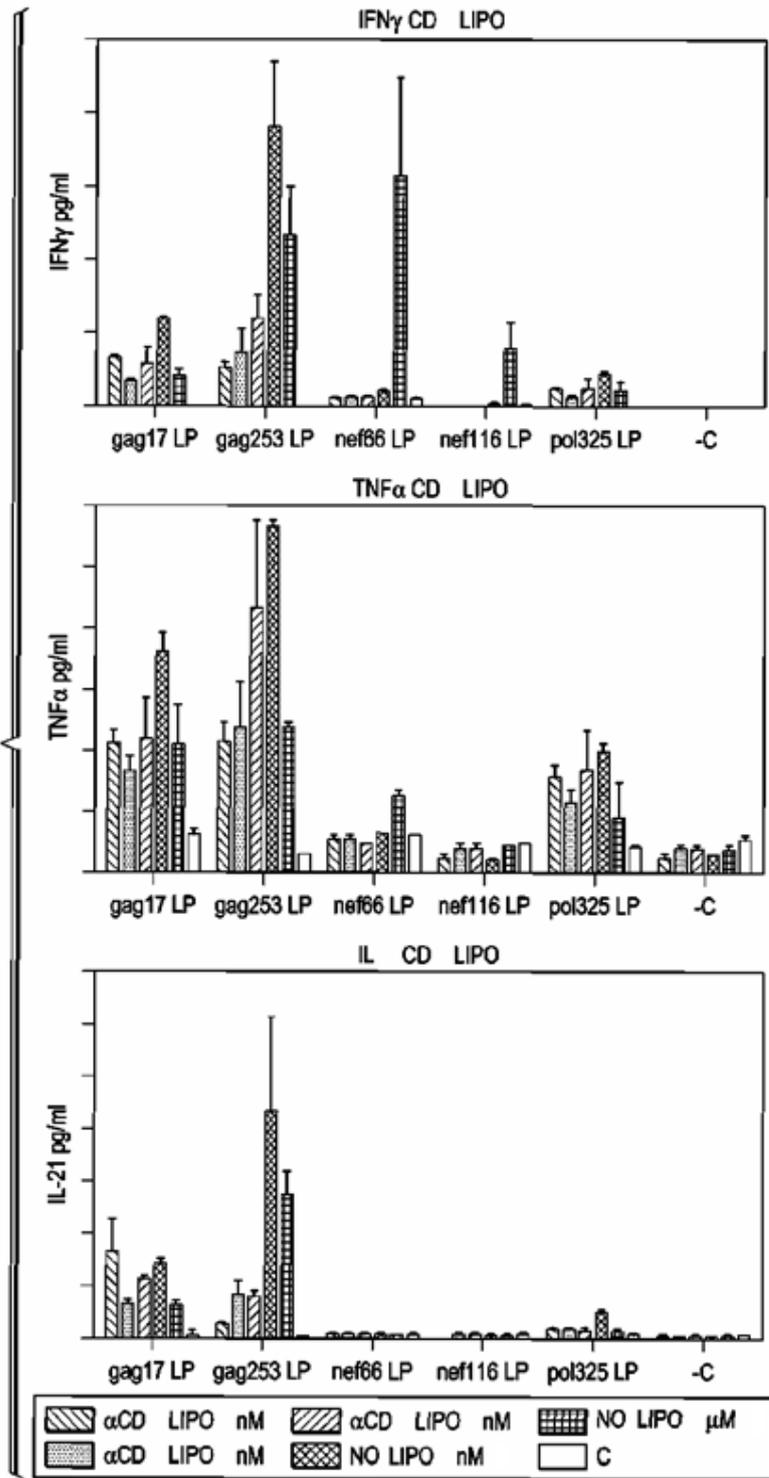


FIG. 10B

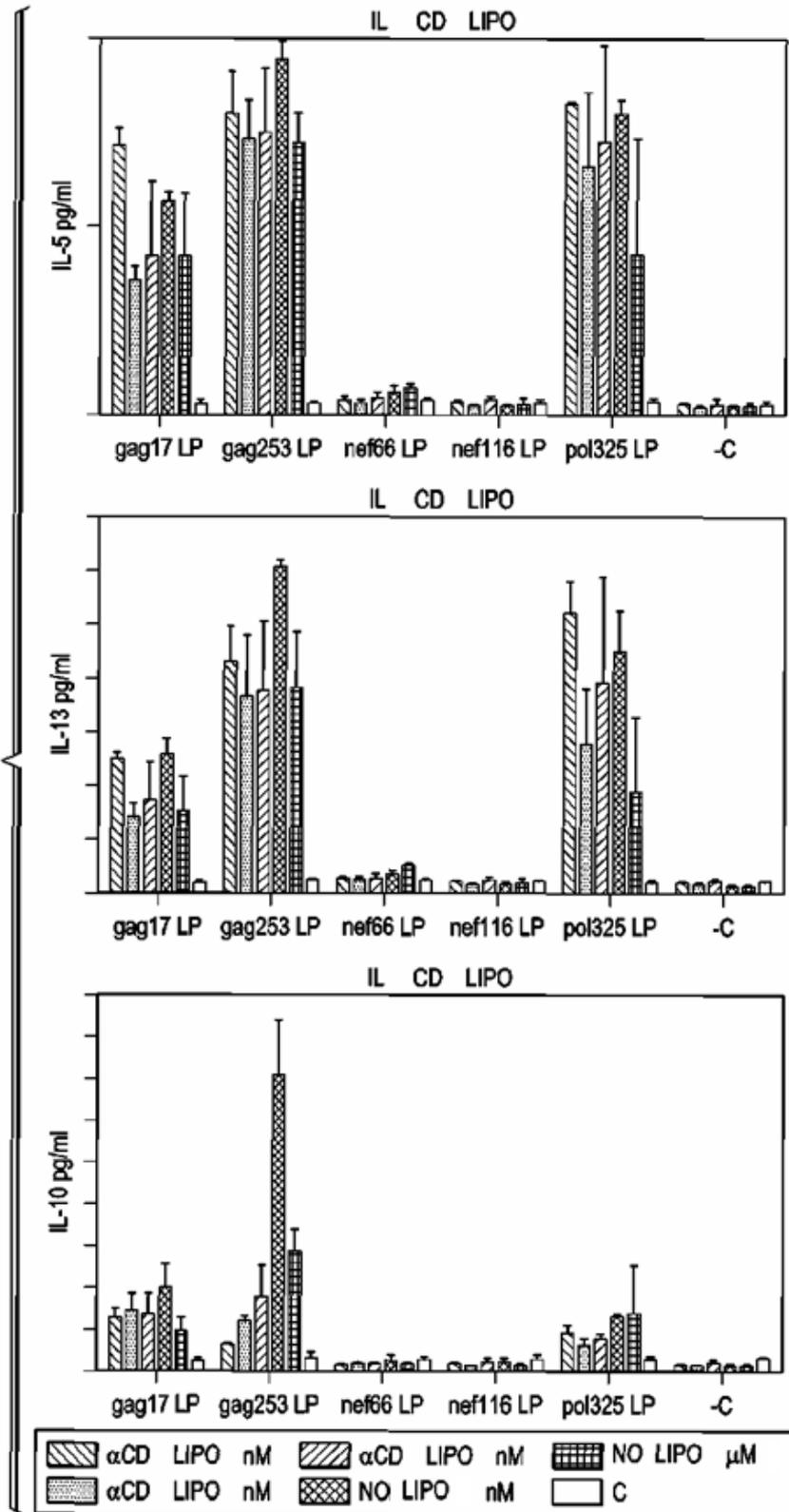


FIG. 11A

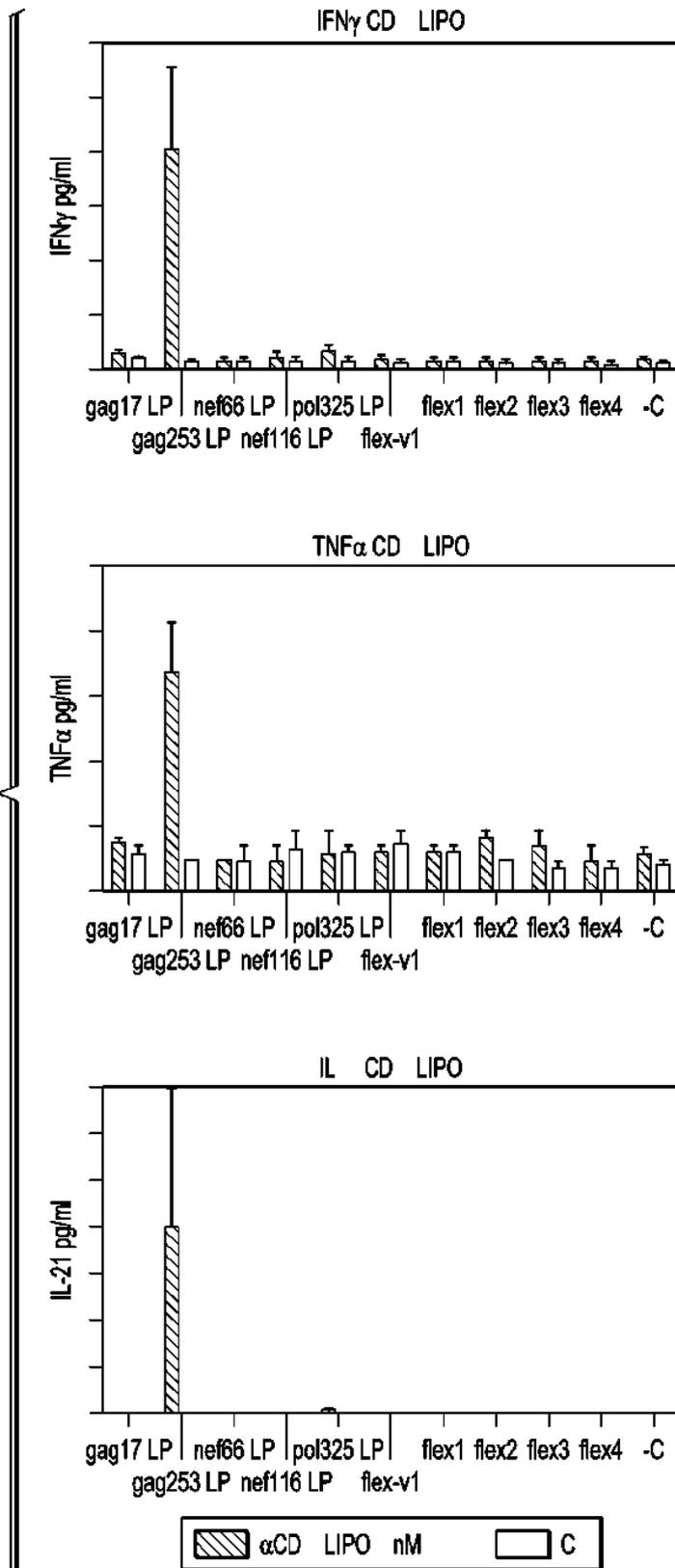
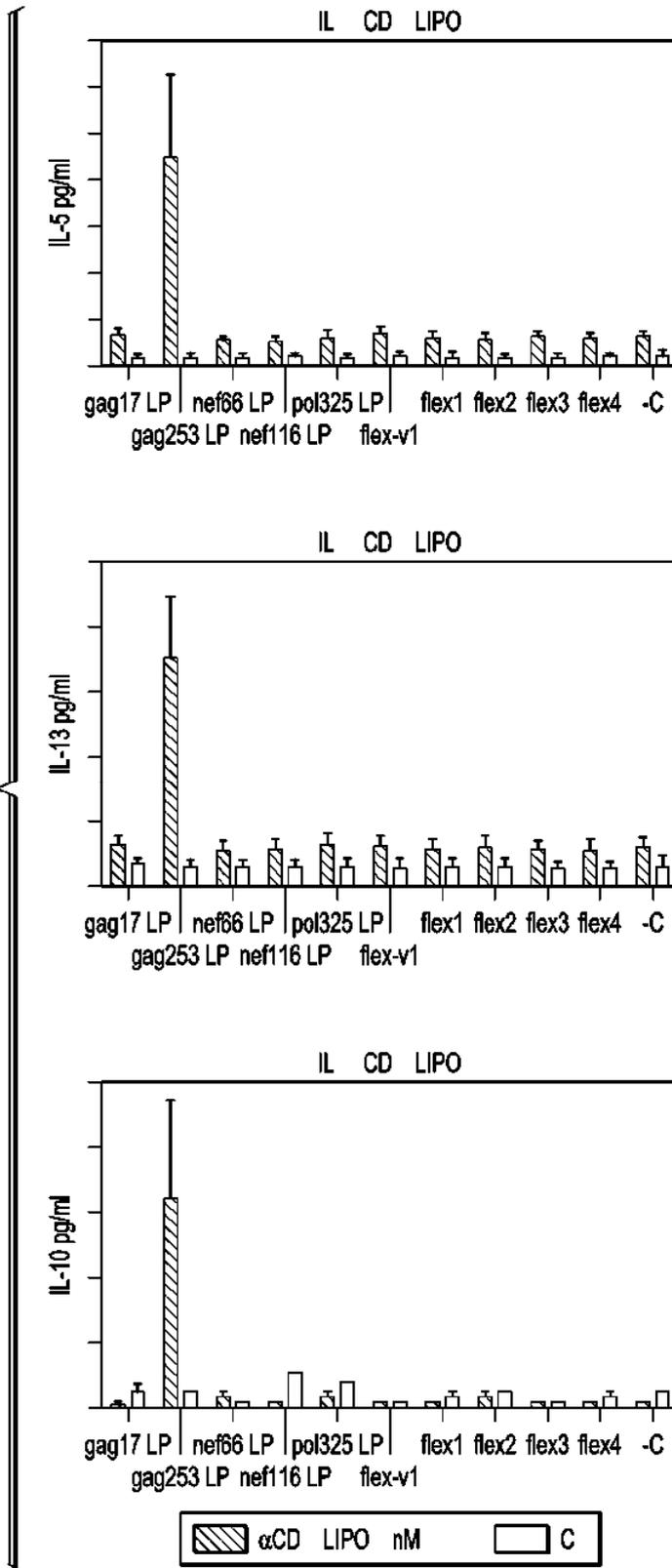
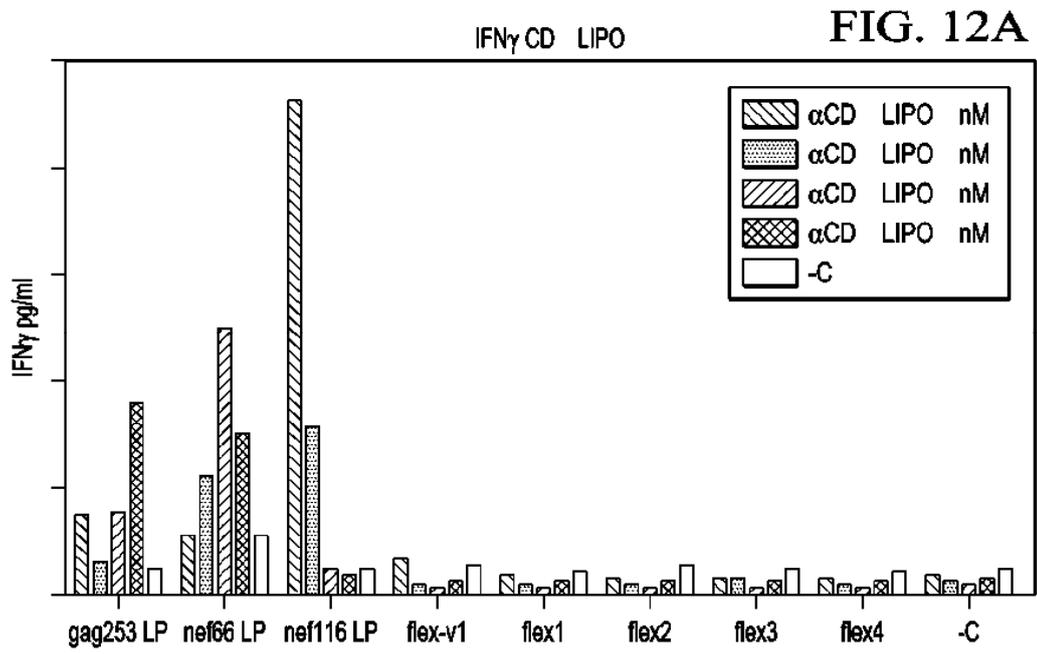


FIG. 11B





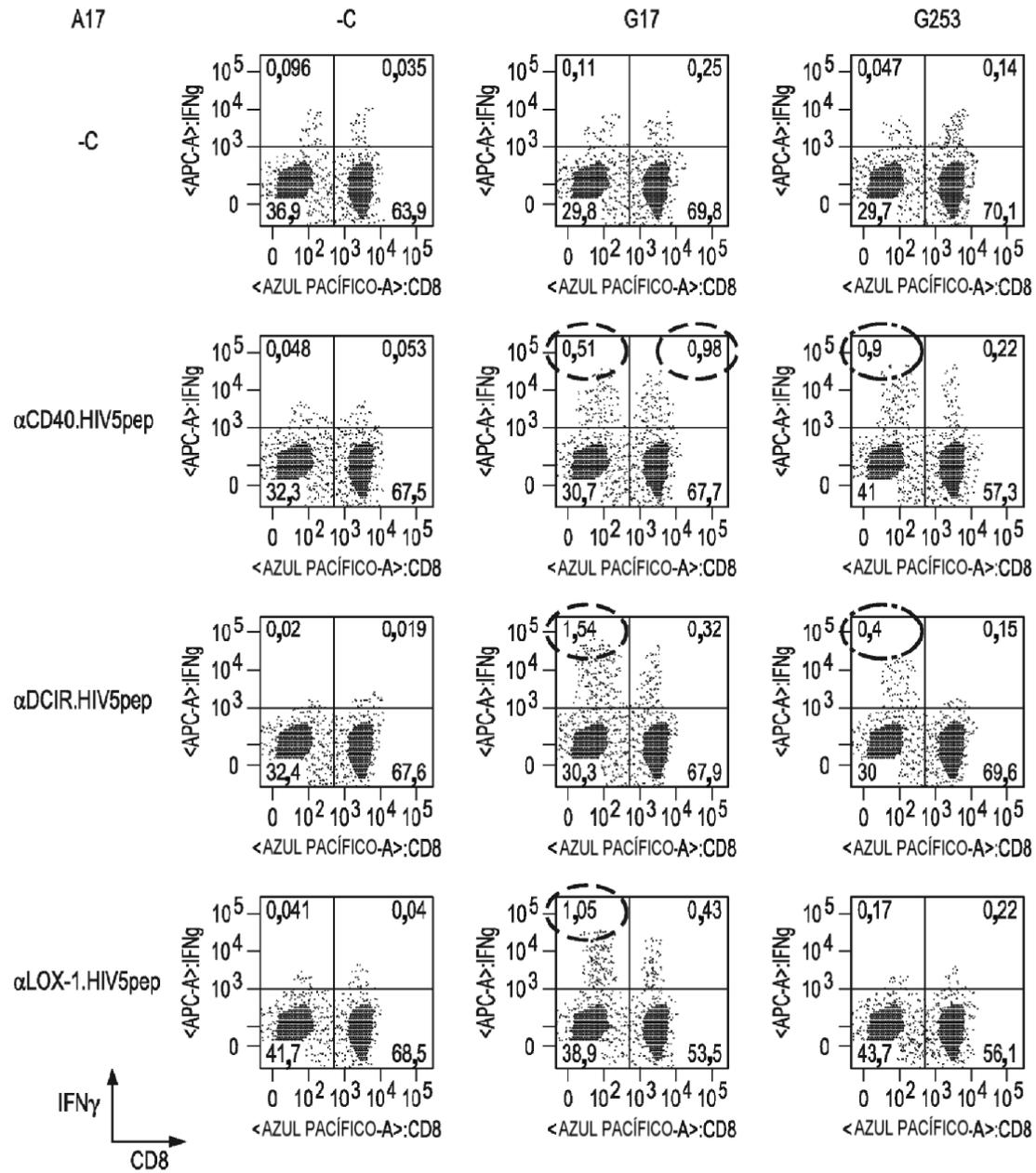


FIG. 12B-1

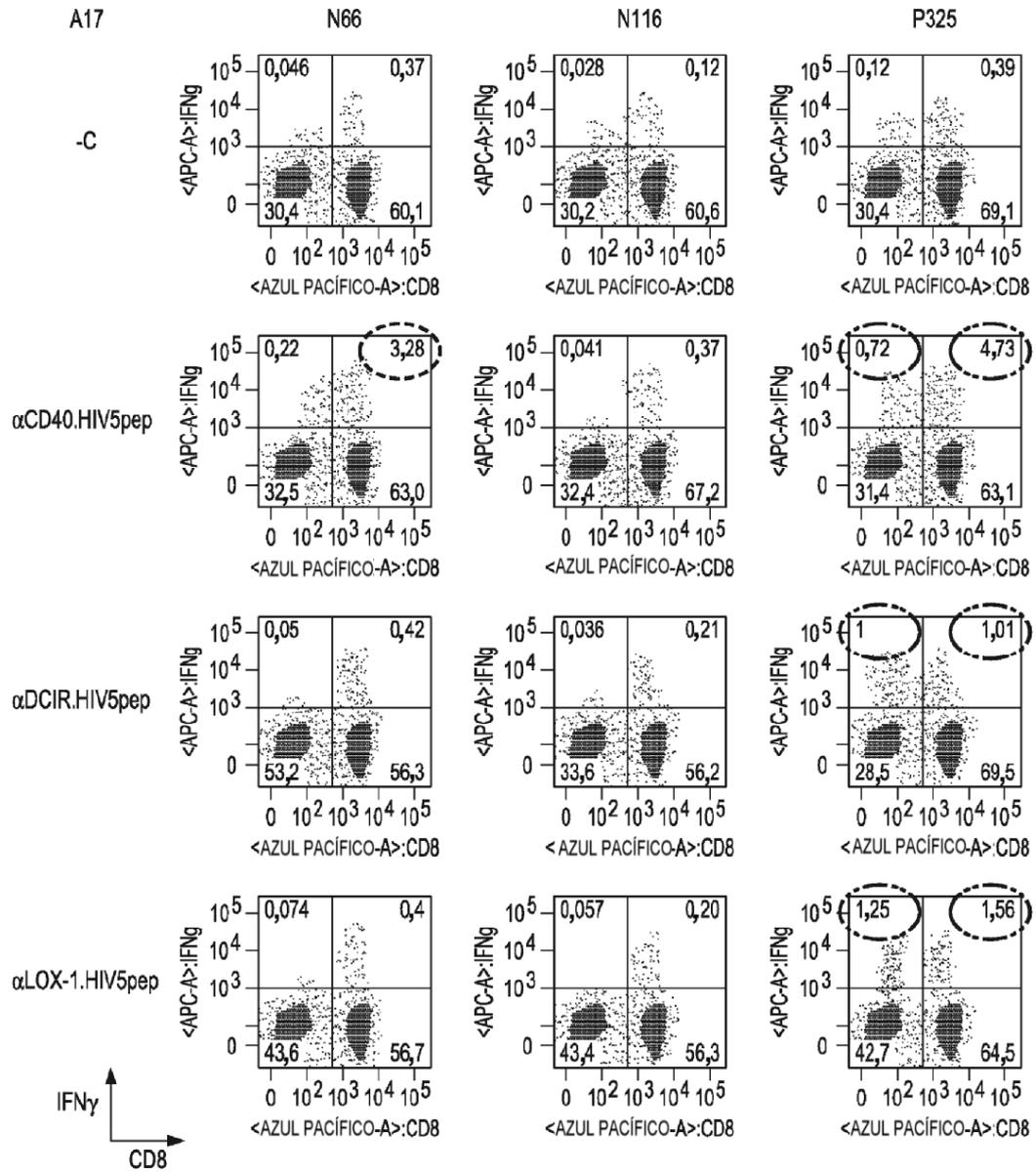


FIG. 12B-2

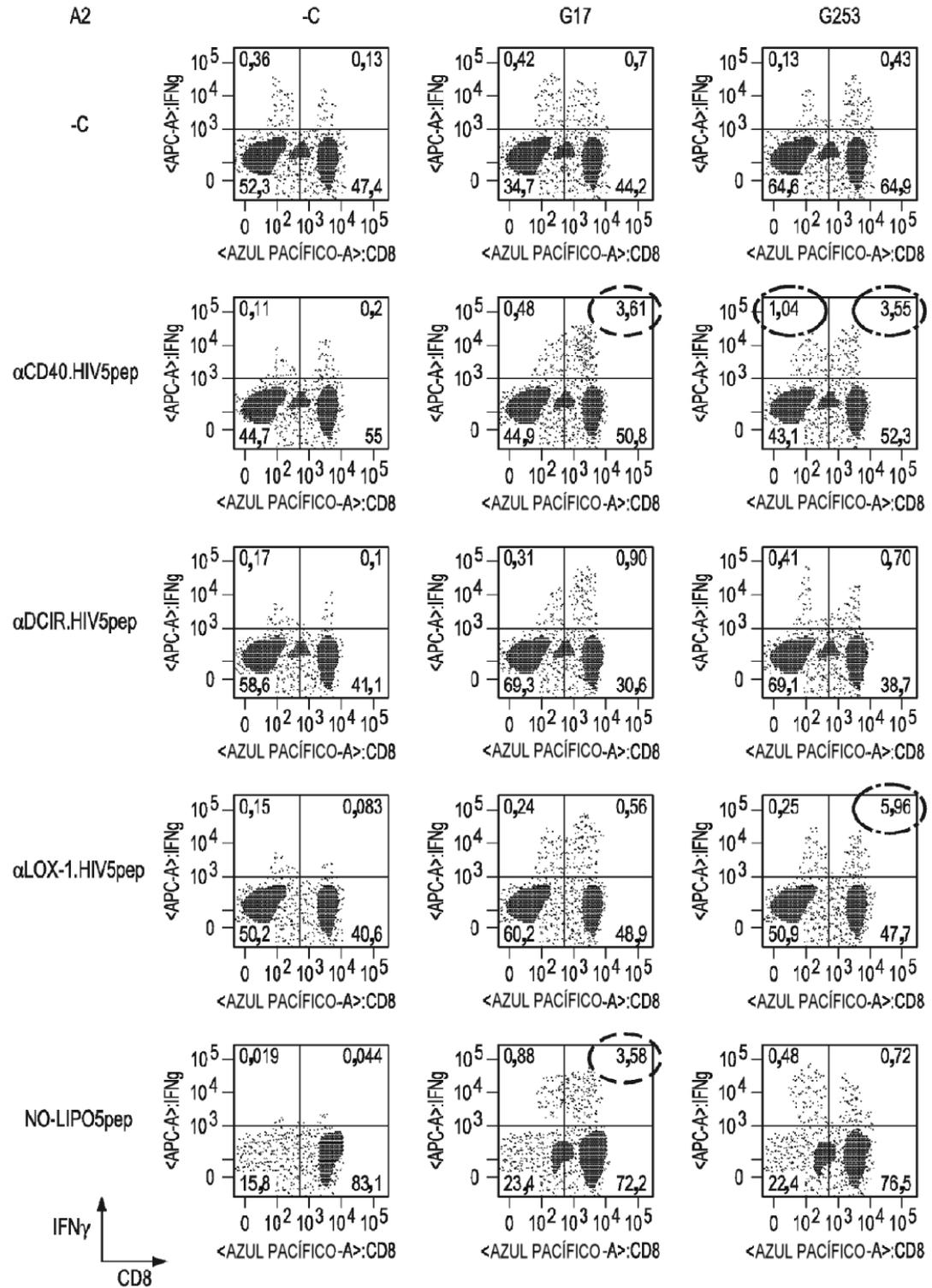


FIG. 12C-1

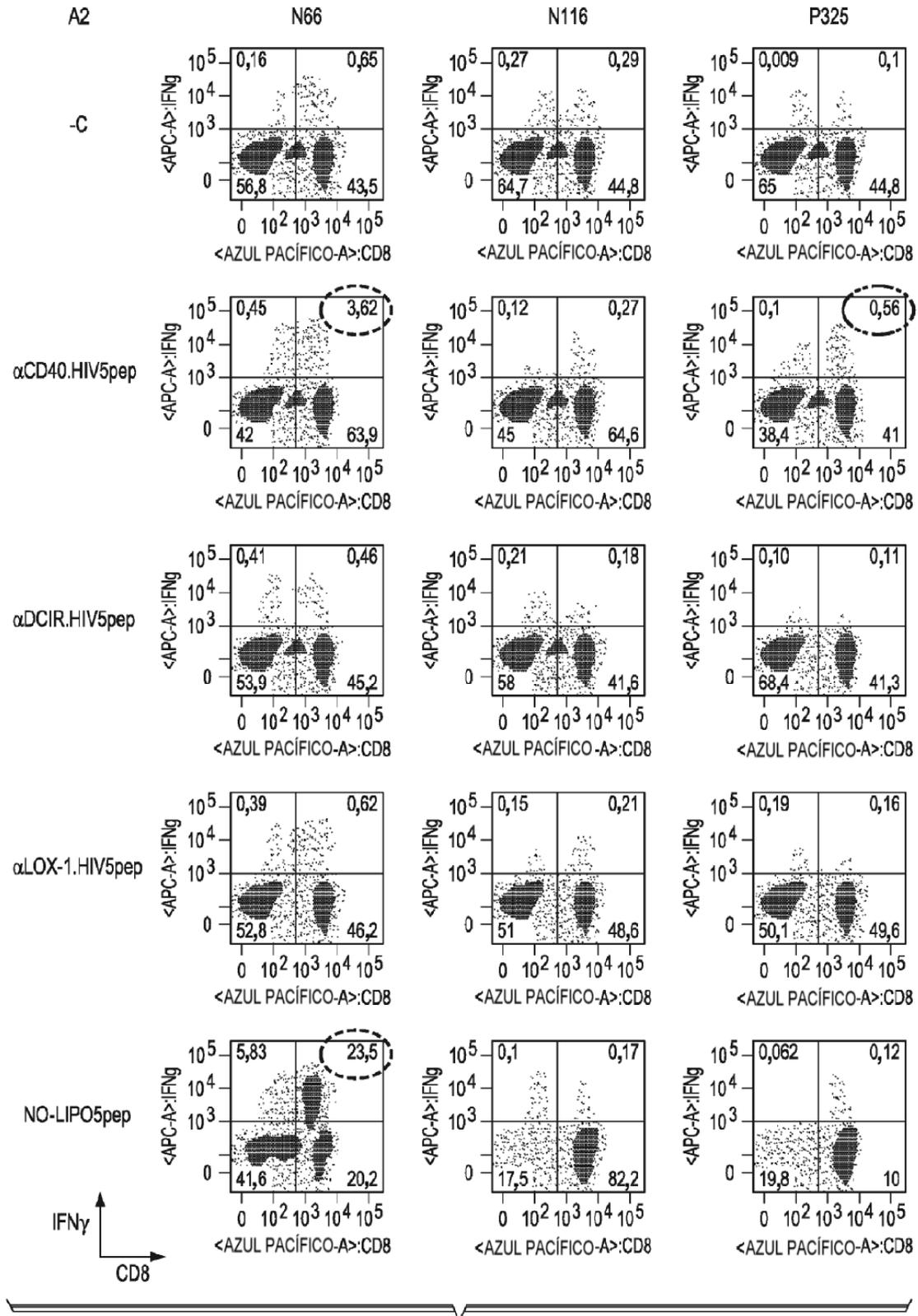


FIG. 12C-2

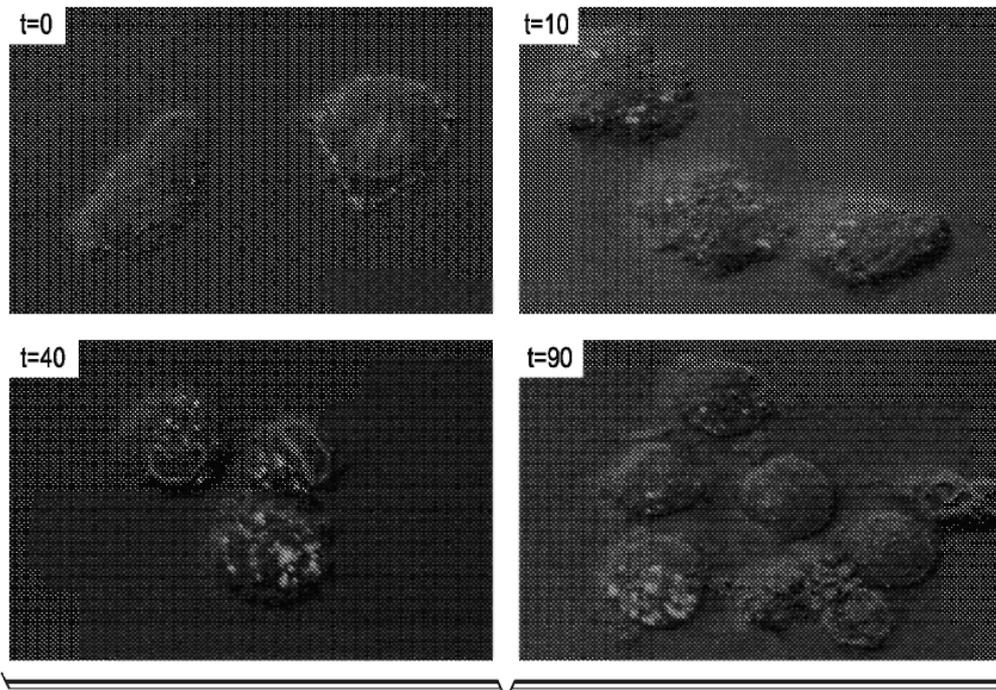
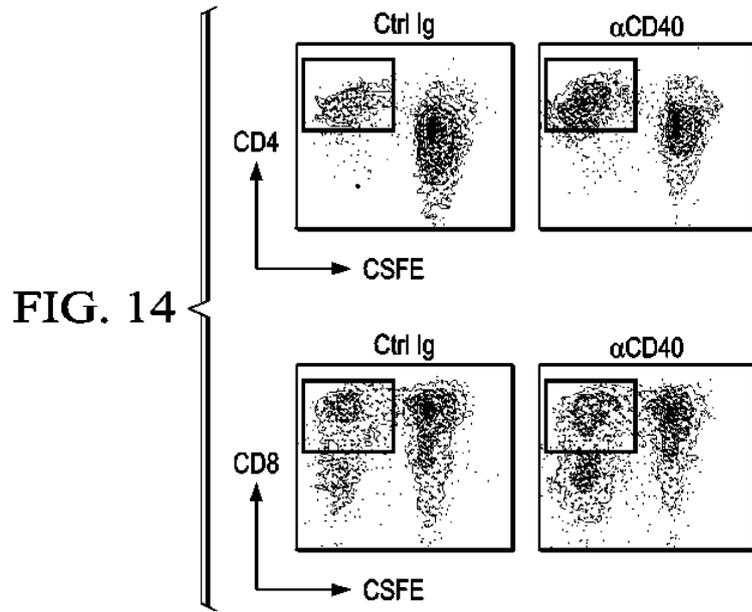
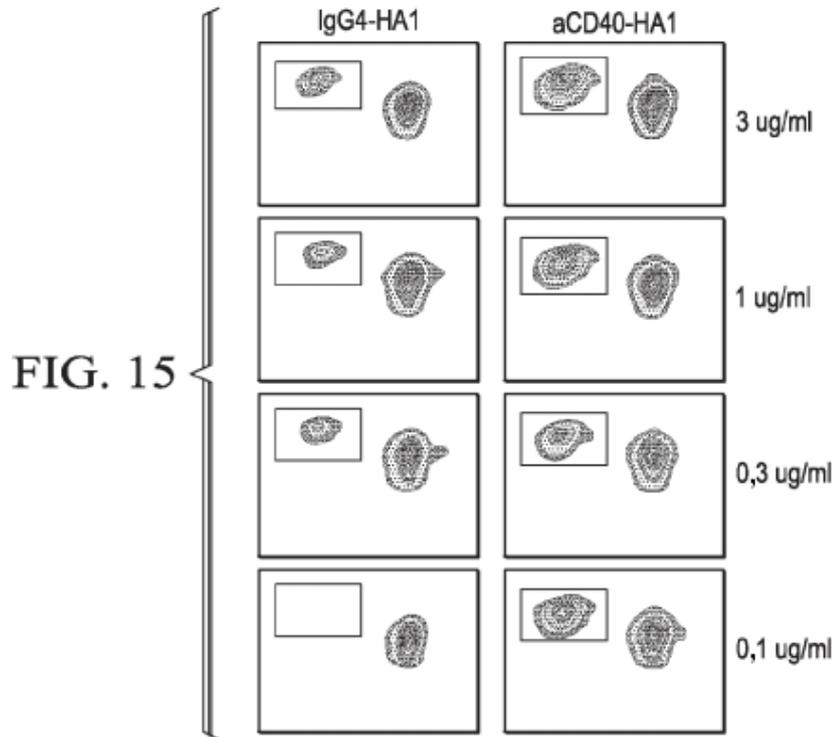


FIG. 13





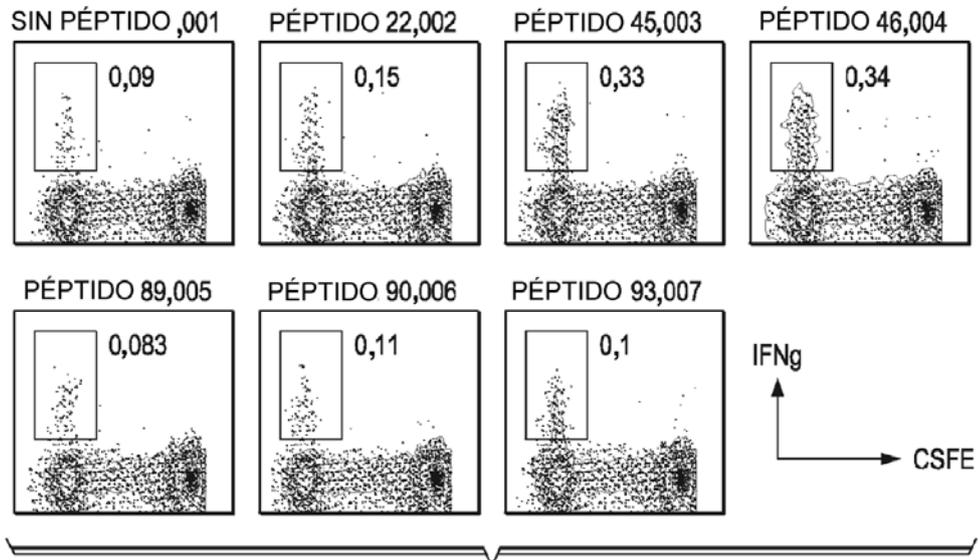
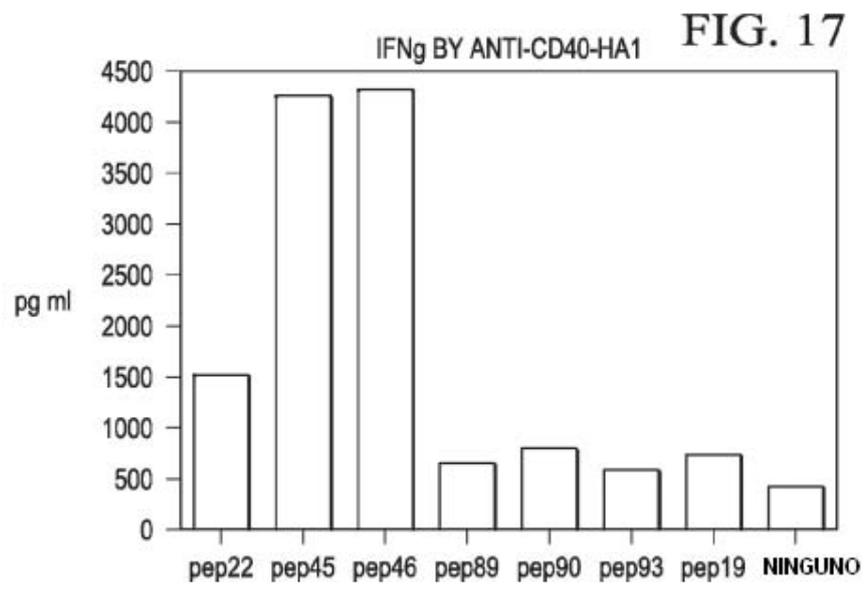


FIG. 16



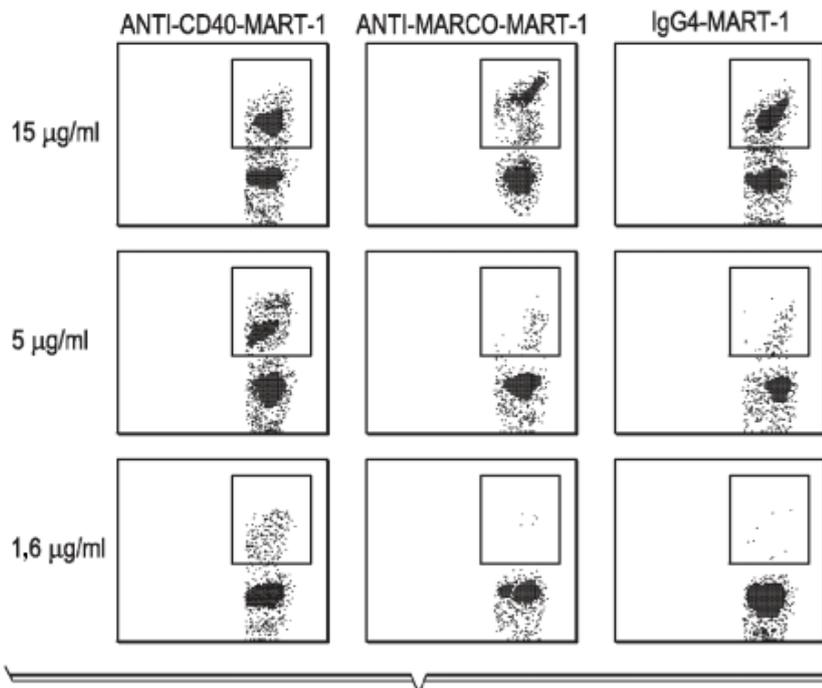


FIG. 18

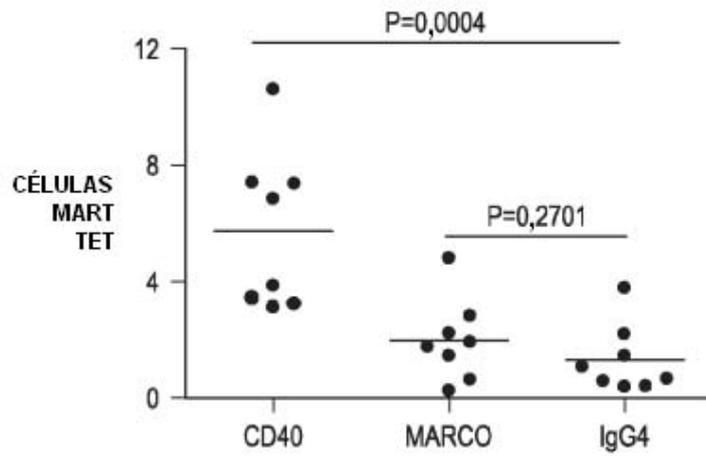


FIG. 19

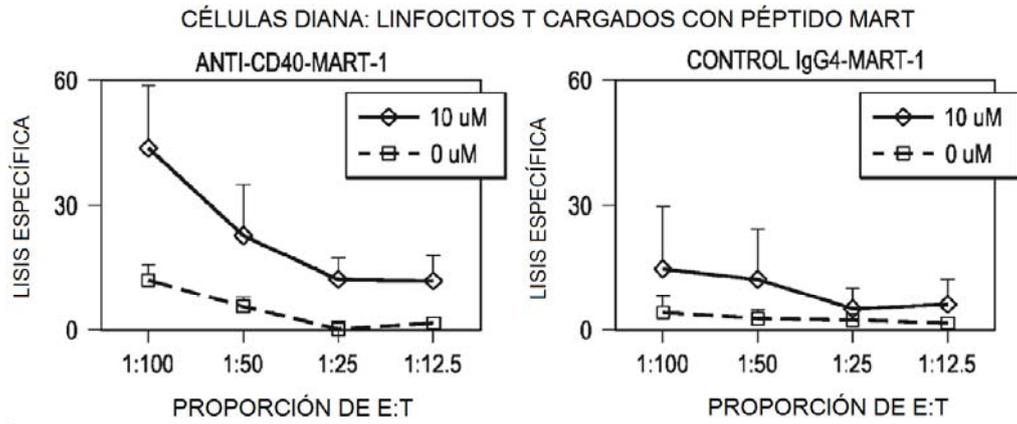


FIG. 20

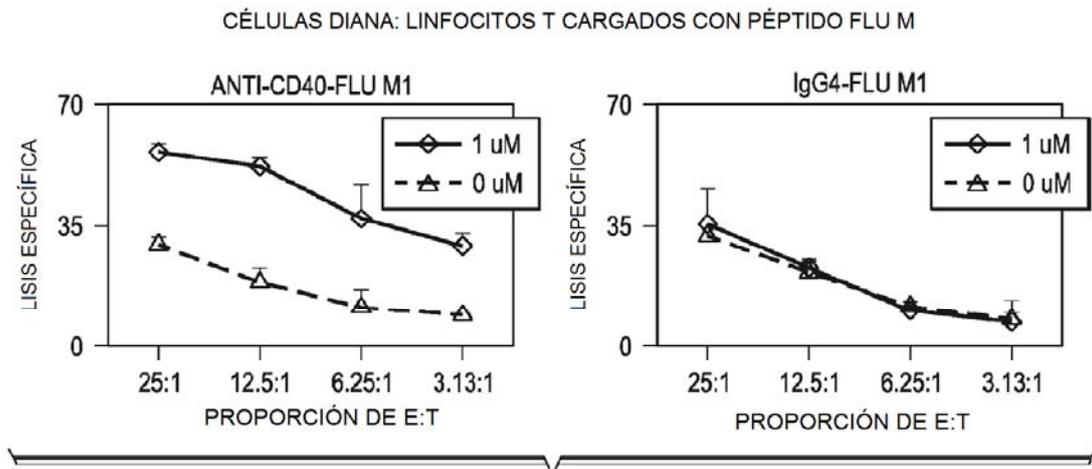


FIG. 21

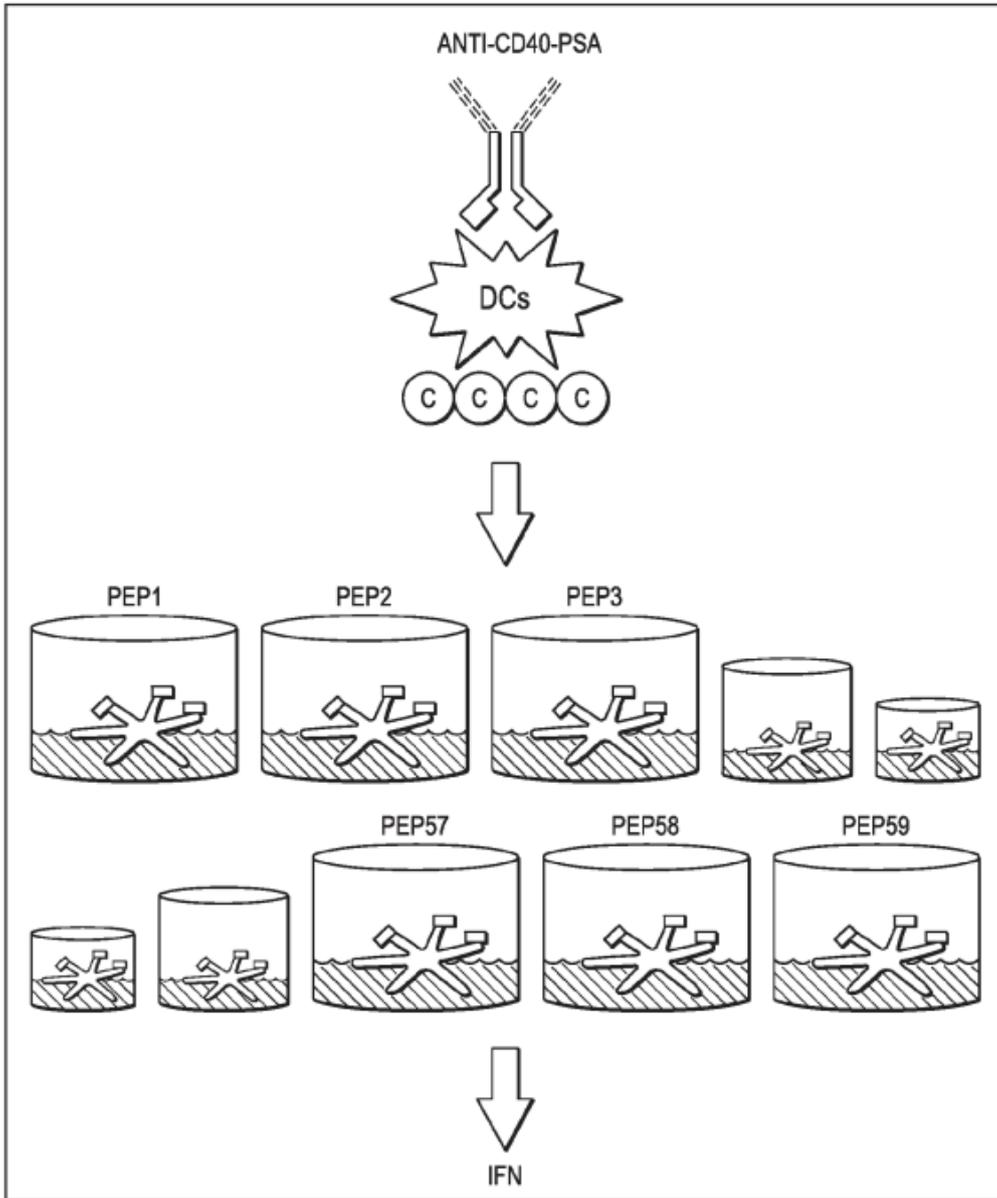
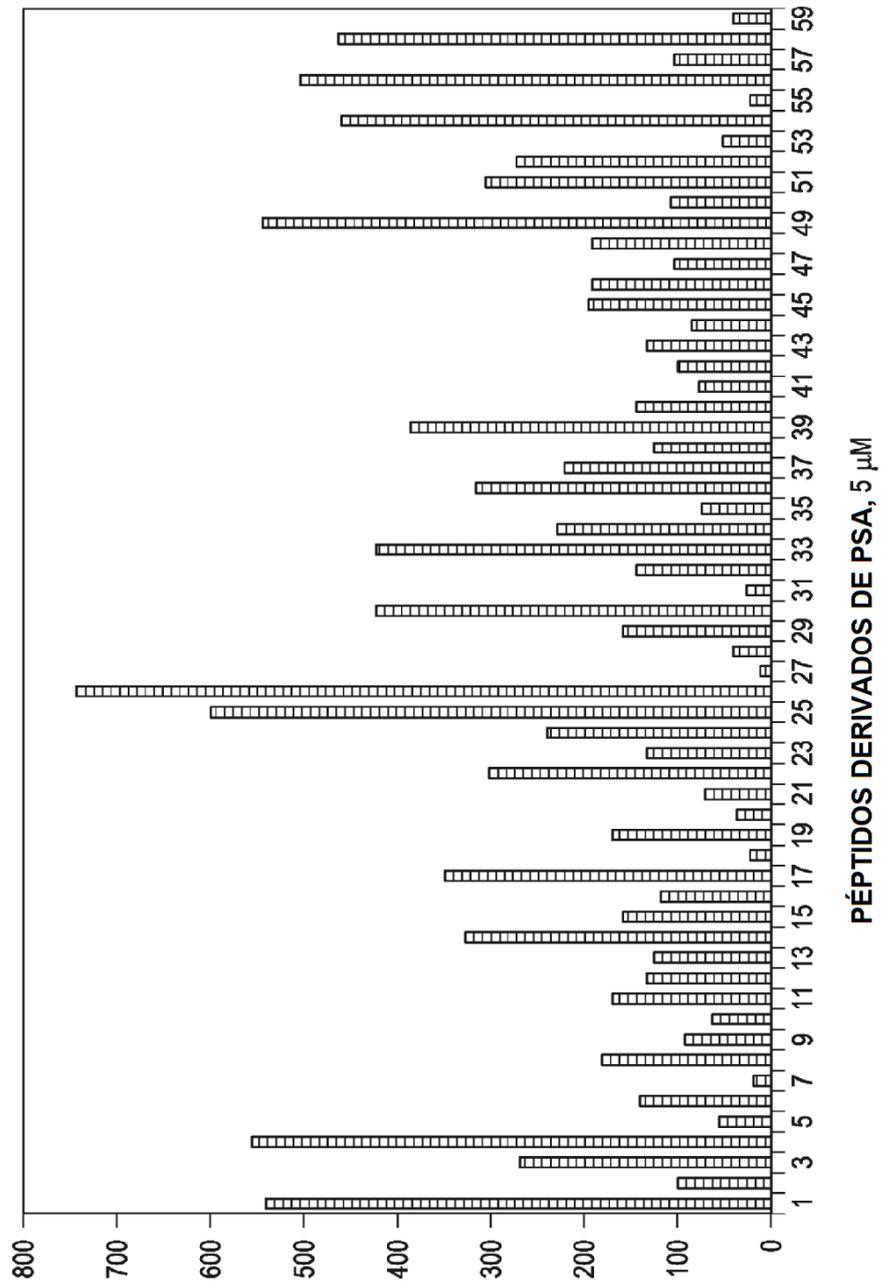


FIG. 22

FIG. 23



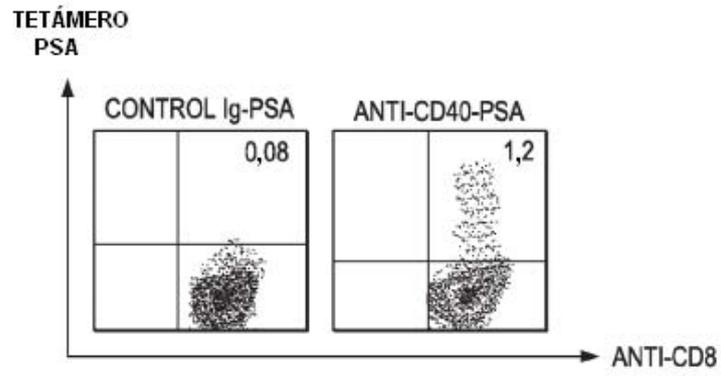
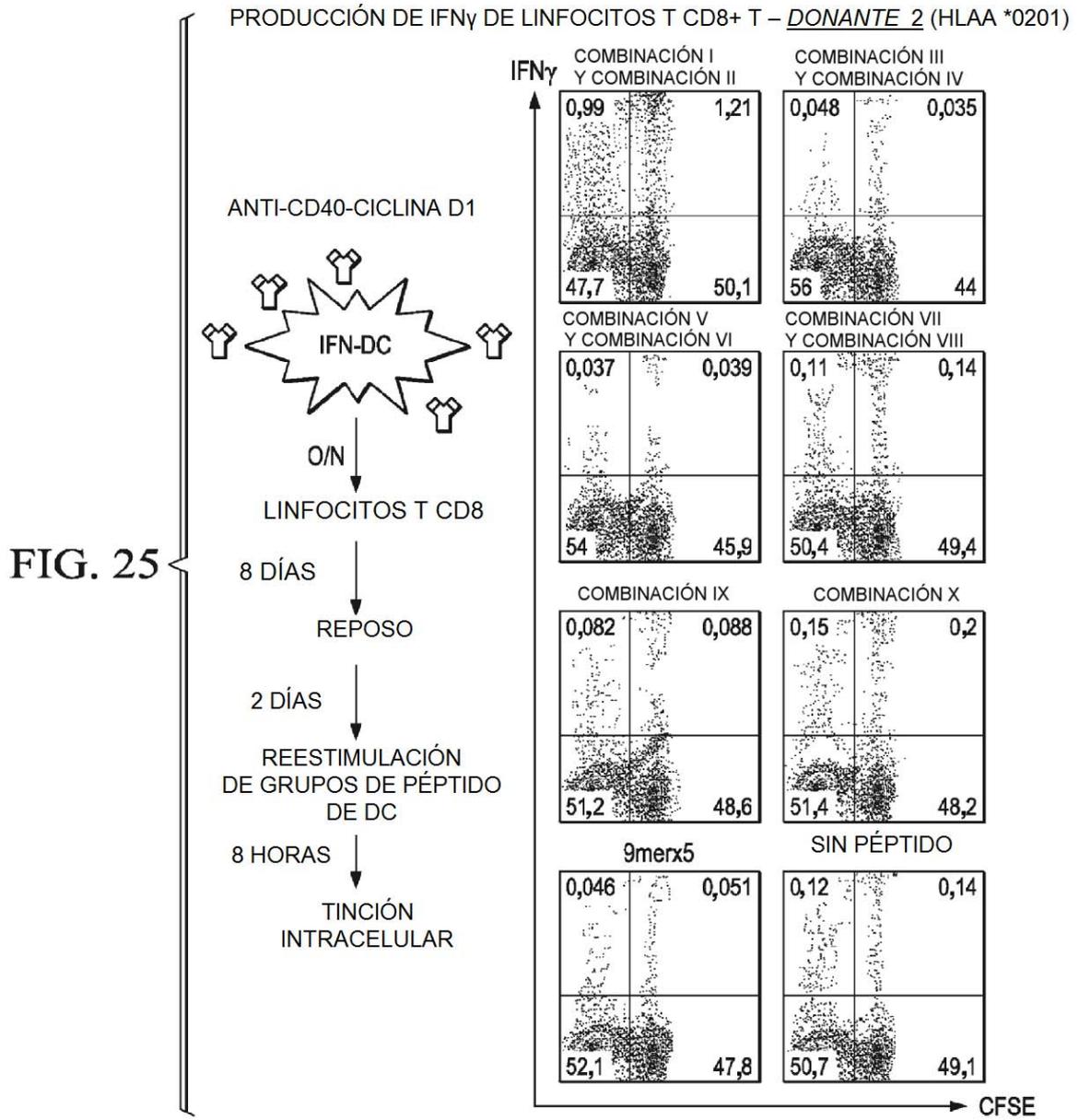


FIG. 24



PRODUCCIÓN DE IFN γ DE LINFOCITOS T CD8+ T - DONANTE_2 (HLAA *0201)

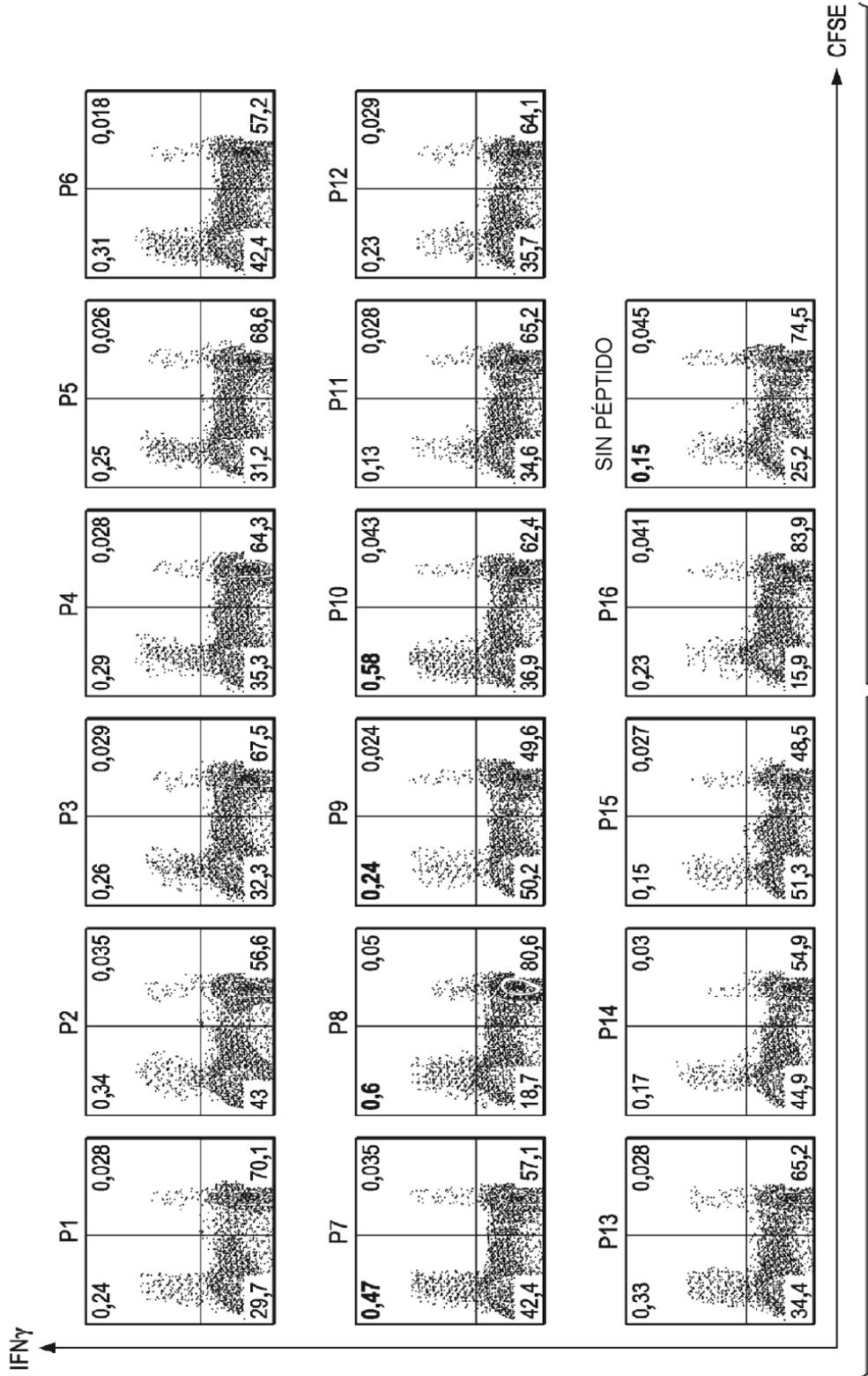


FIG. 26

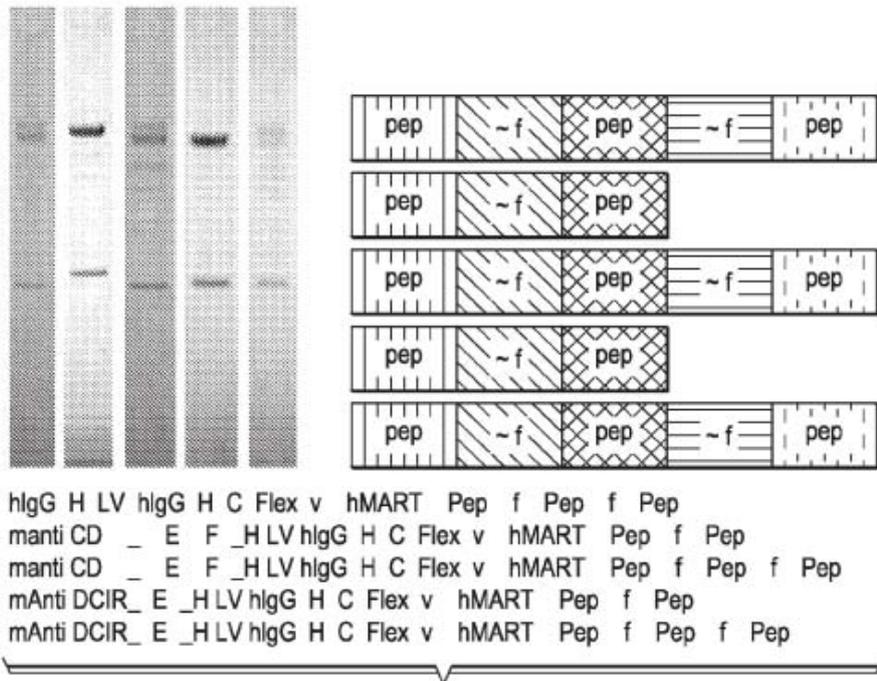


FIG. 27

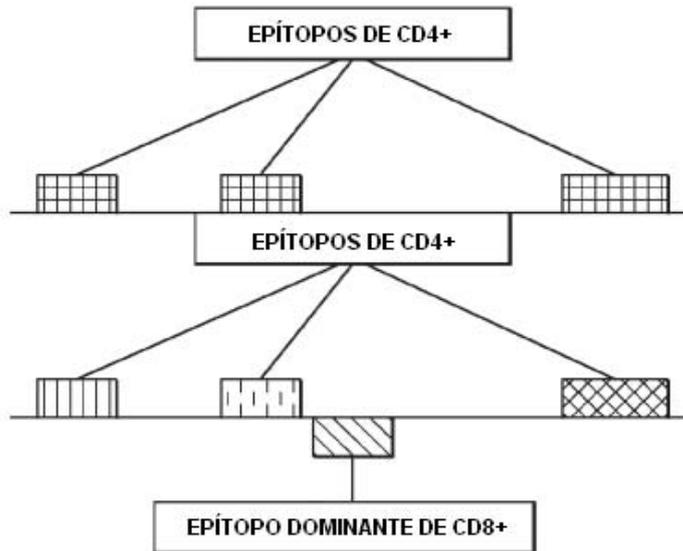


FIG. 28

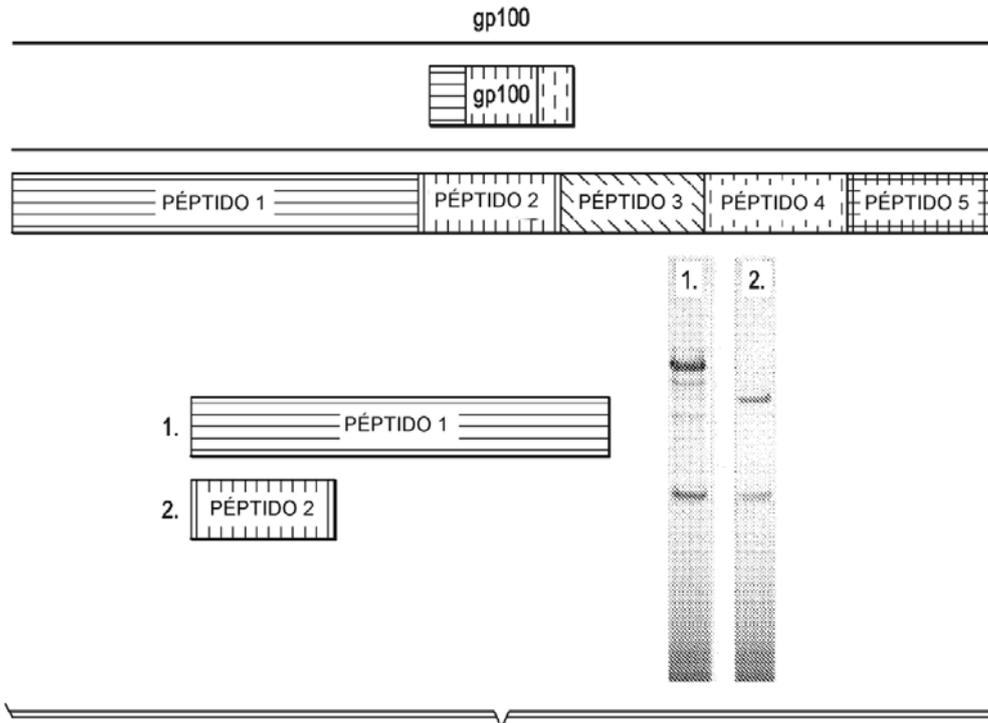


FIG. 29

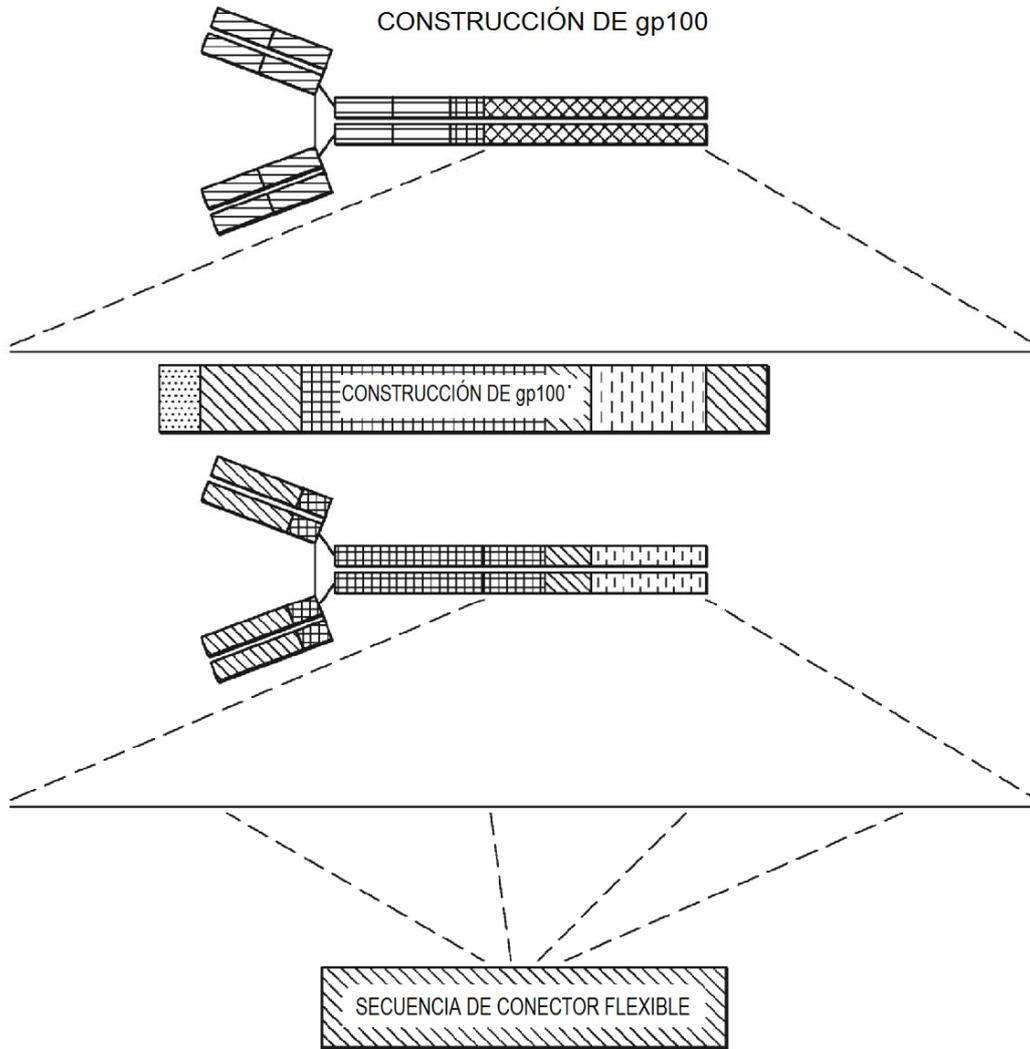


FIG. 30

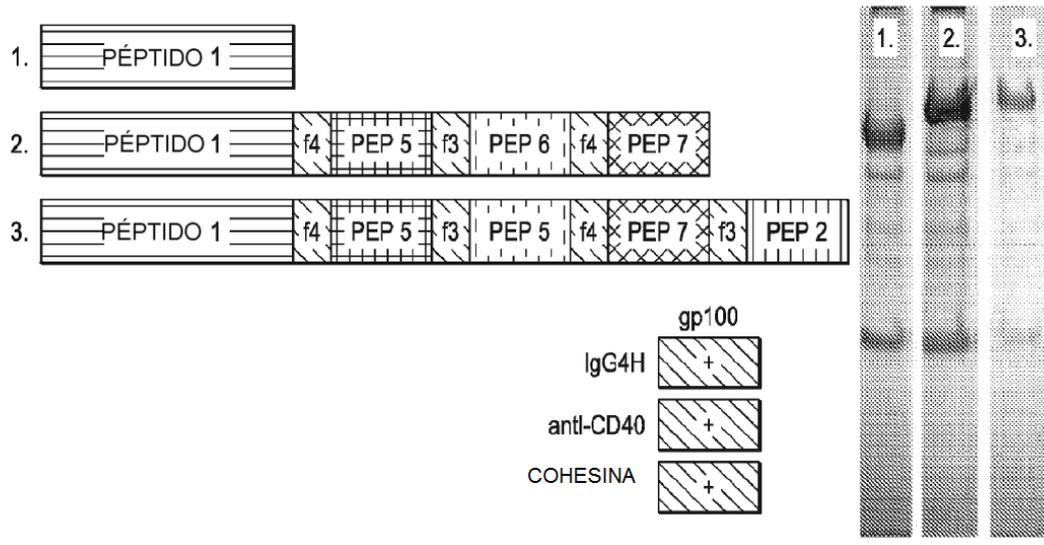


FIG. 31

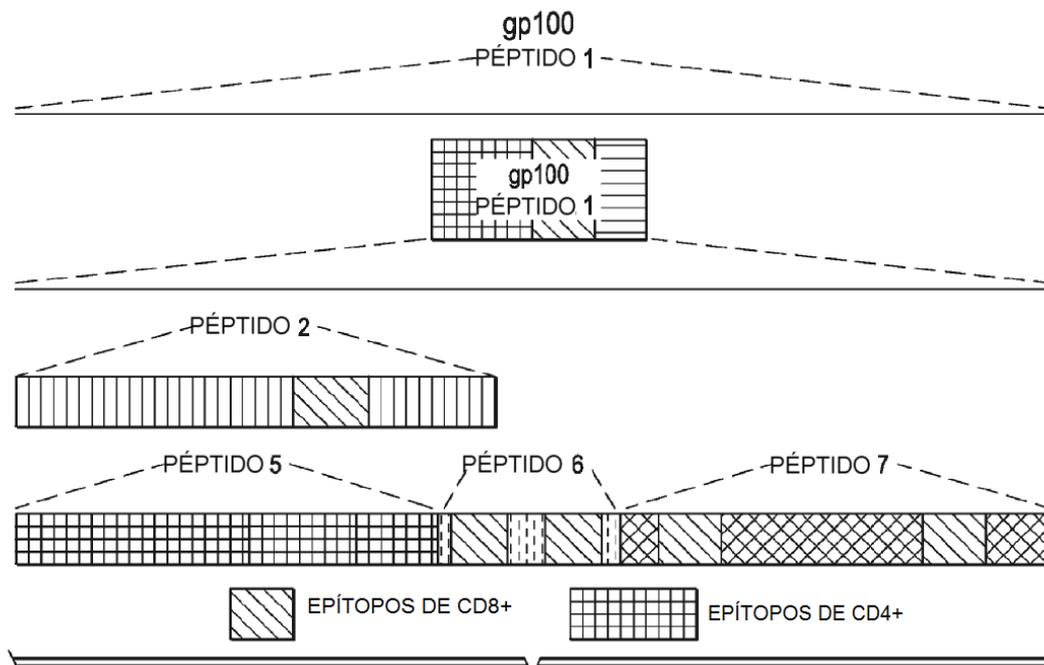


FIG. 32

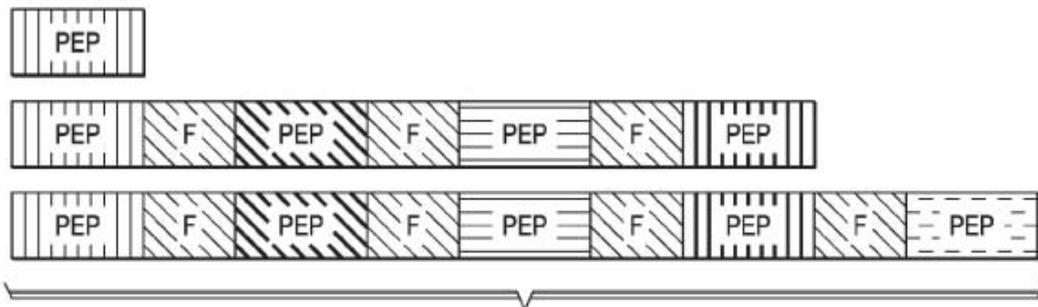
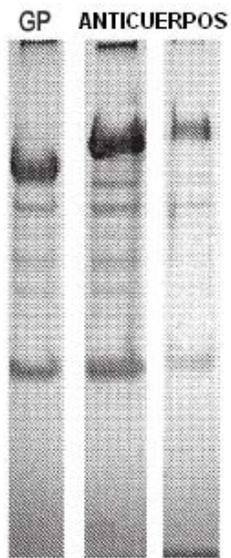


FIG. 33

ENSAYO DE PROLIFERACIÓN DE CD40 Fas/CD40

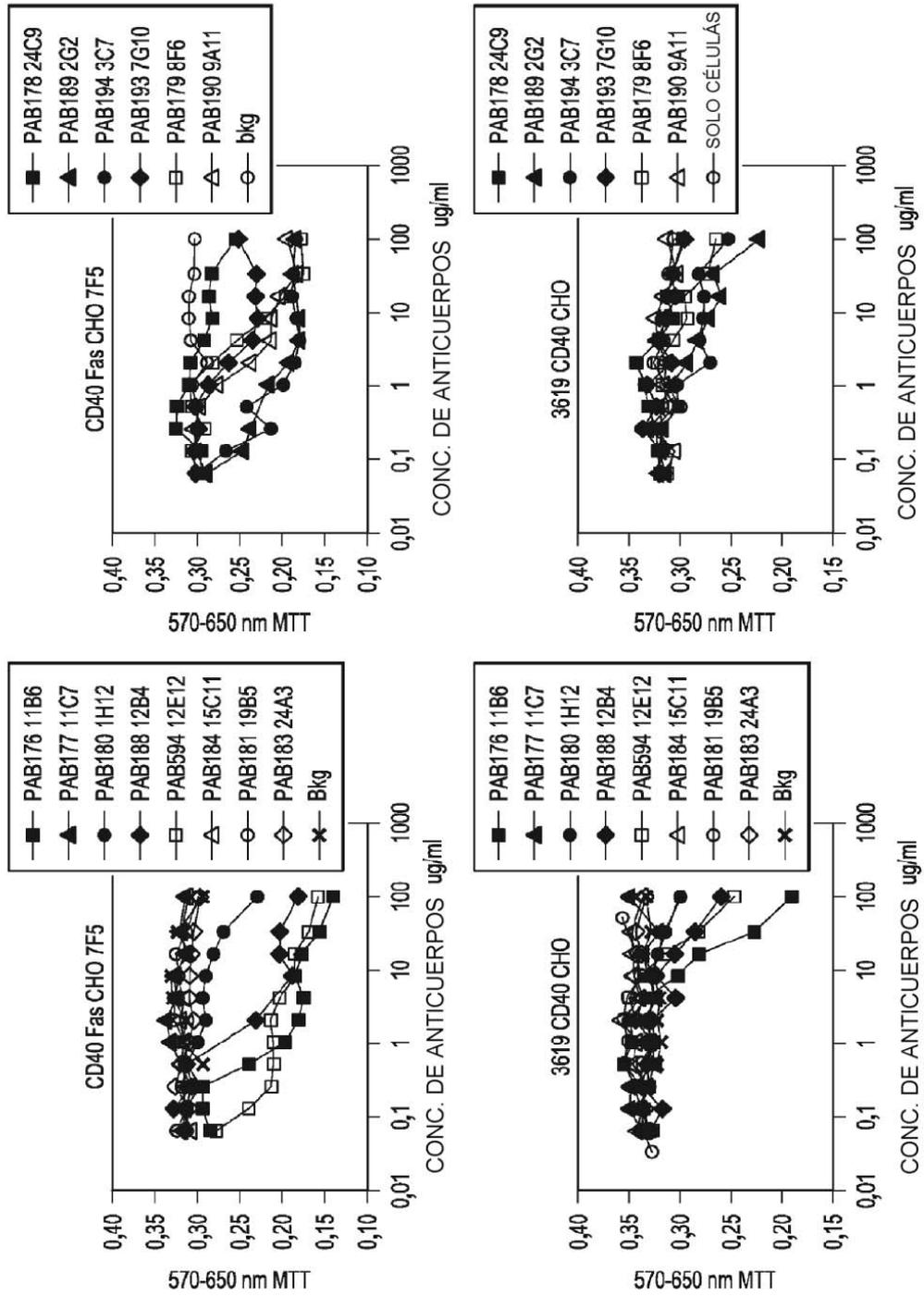


FIG. 34

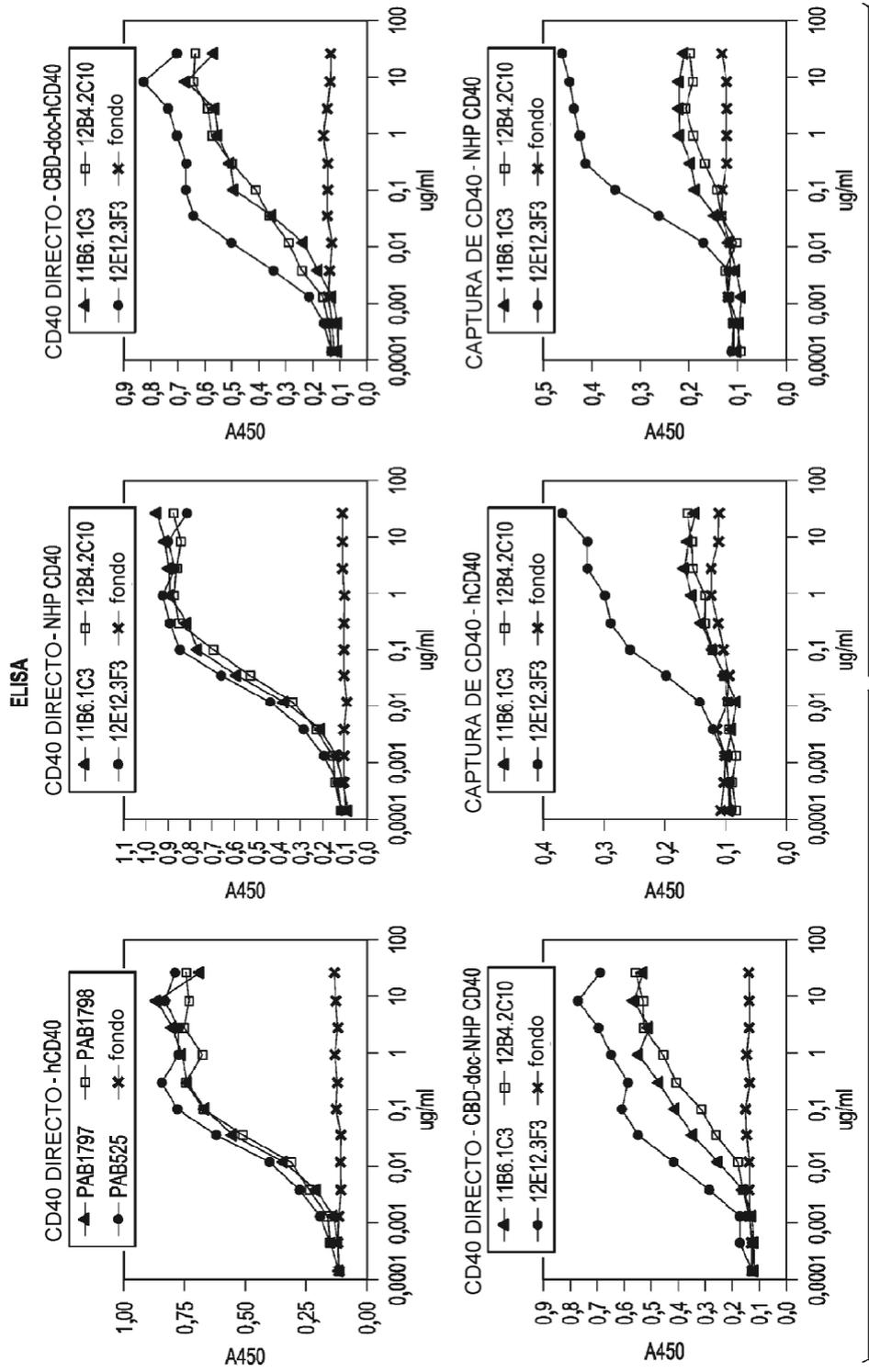


FIG. 35

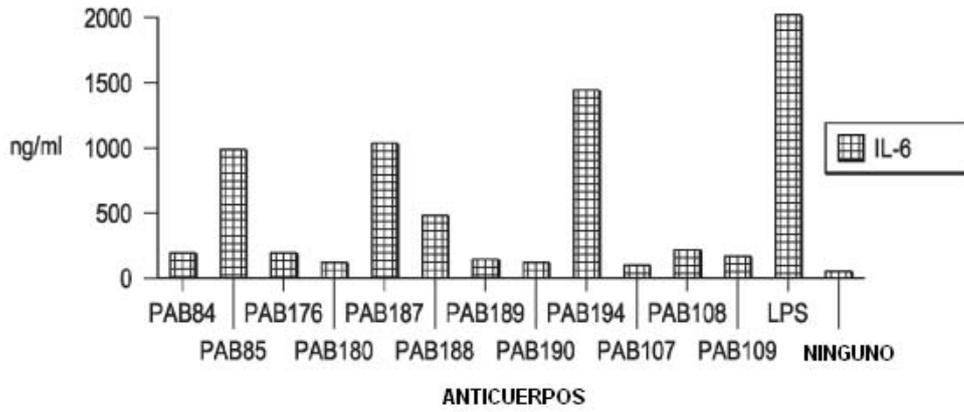


FIG. 36A

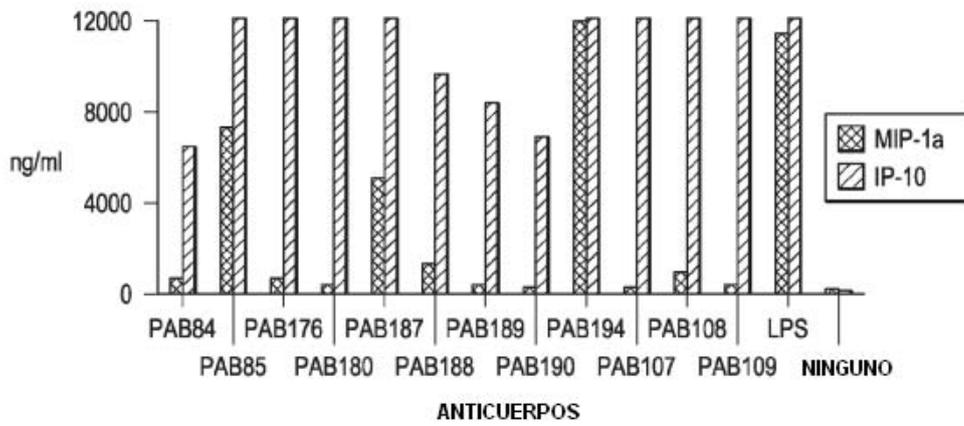


FIG. 36B

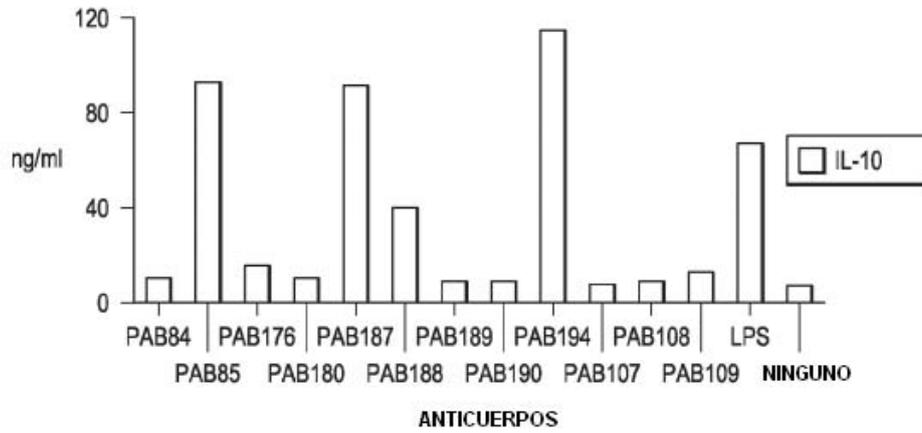


FIG. 36C

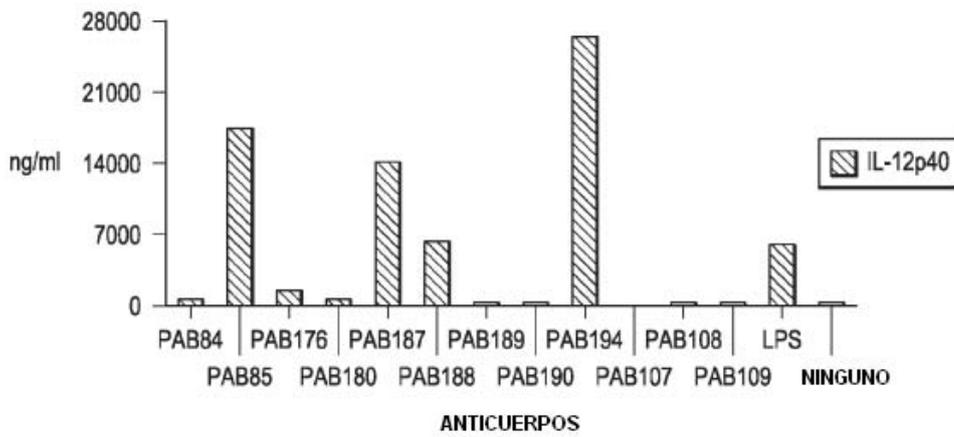


FIG. 36D

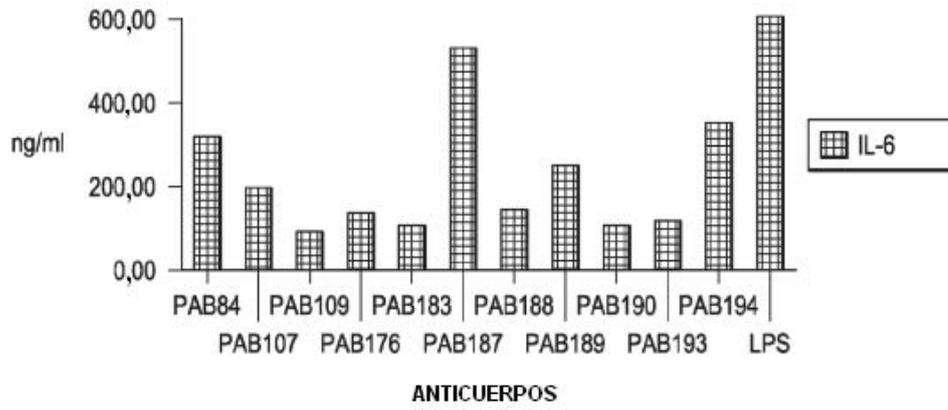


FIG. 37A

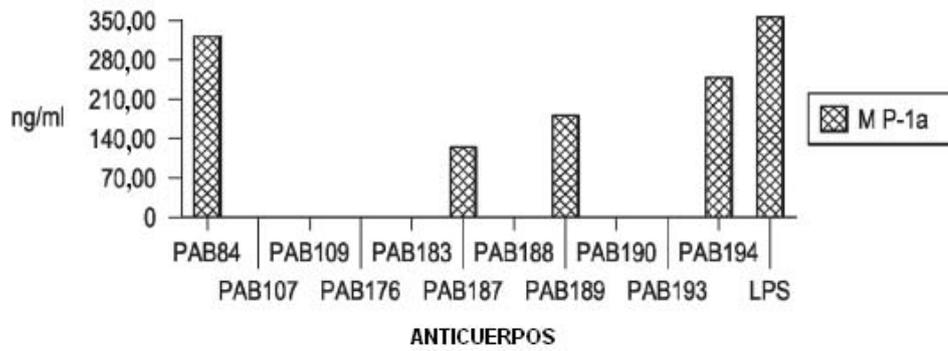


FIG. 37B

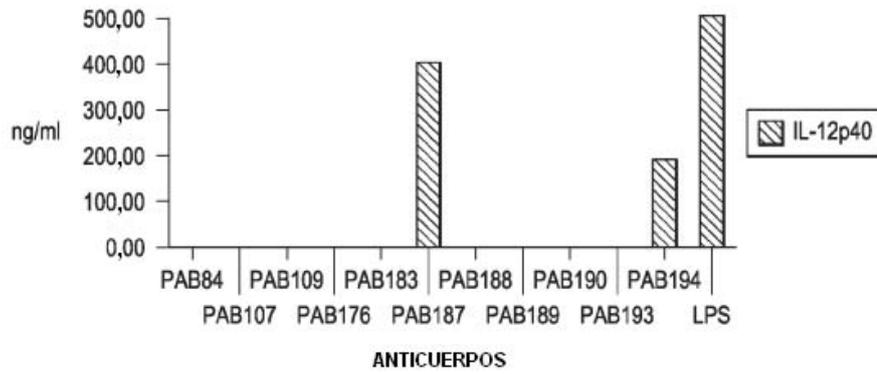


FIG. 37C

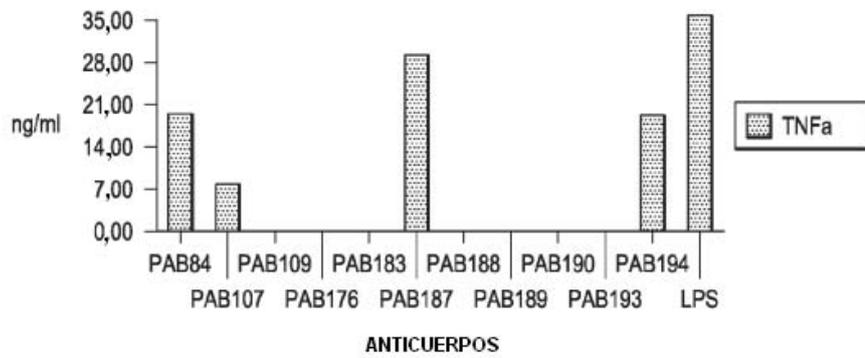


FIG. 37D

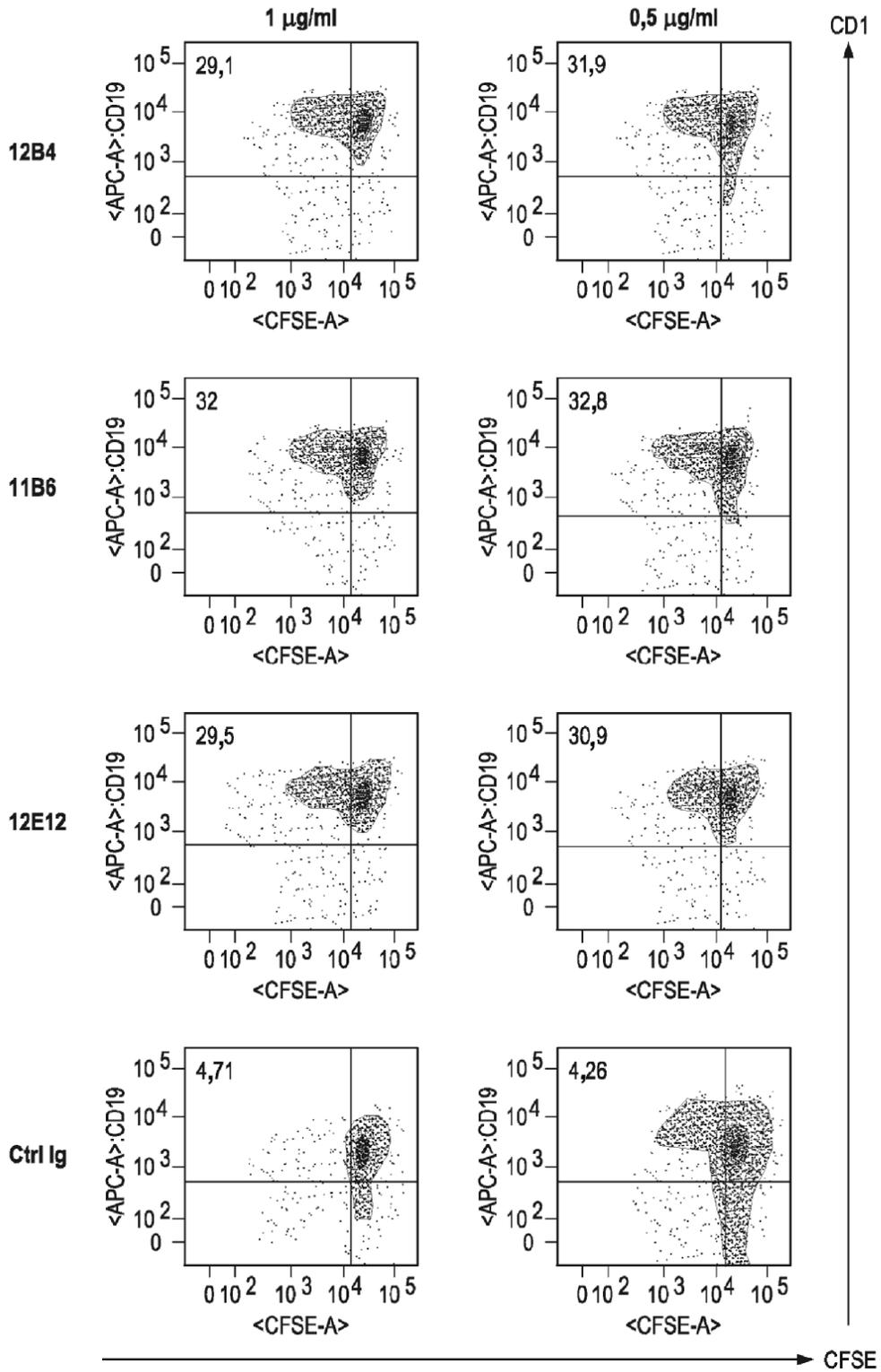


FIG. 38A

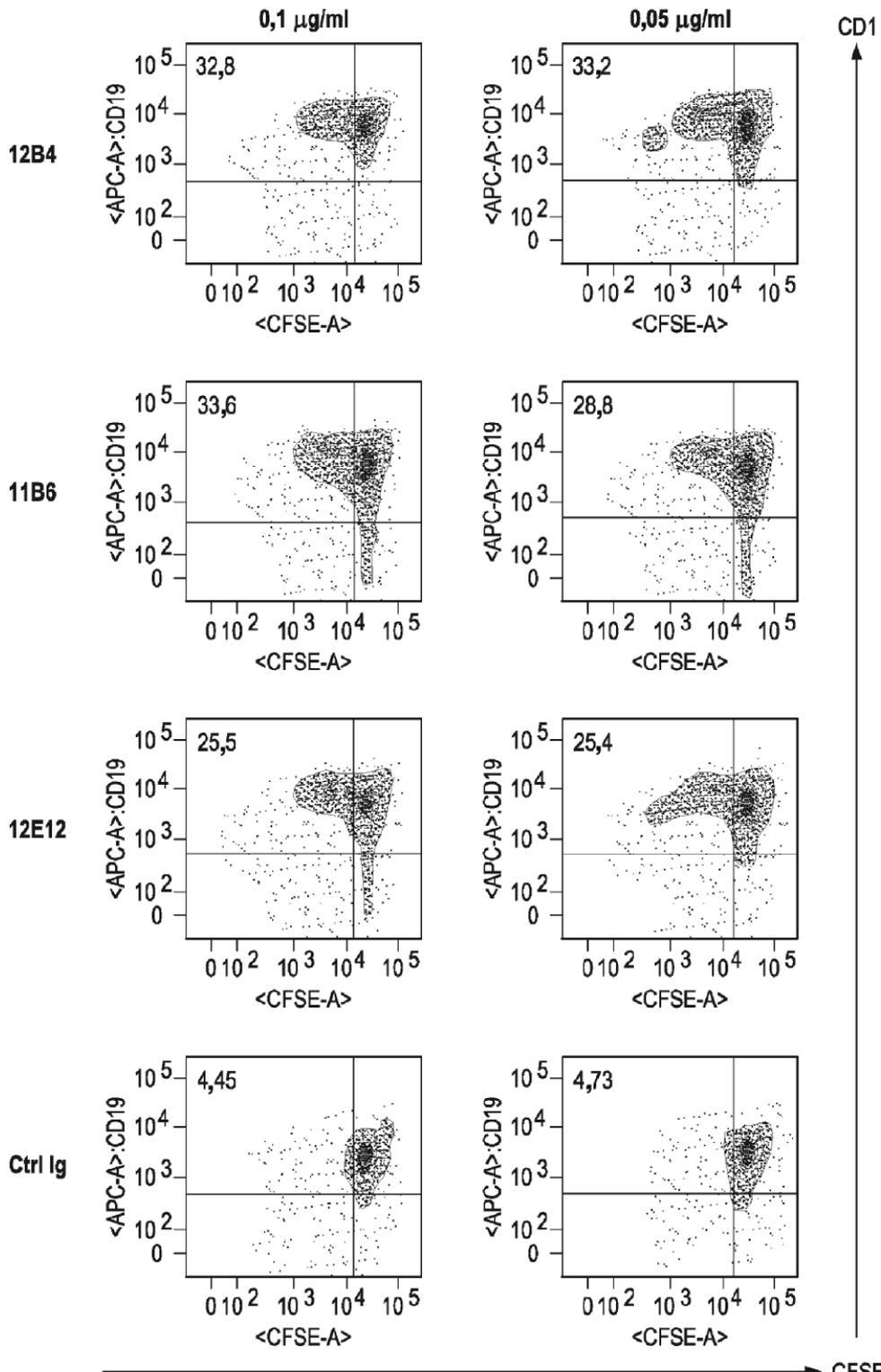


FIG. 38B

ULTIMA HOJA AÑADIDA
TOTAL DE HOJAS - 48