



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 333 971**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04810510 .0**

96 Fecha de presentación : **04.11.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1682180**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.07.2006**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales anti-CD40 antagonistas y procedimientos para su uso.**

30 Prioridad: **04.11.2003 US 517337 P**
26.11.2003 US 525579 P
27.04.2004 US 565710 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.03.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.03.2010

73 Titular/es: **Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc.**
4560 Horton Street
Emeryville, California 94608, US

72 Inventor/es: **Long, Li;**
Luqman, Mohammad;
Yabannavar, Asha;
Zaror, Isabel;
Chen, Bao-Lu;
Lu, Xiaofeng;
Lee, Sang, Hoon y
Hurst, Deborah

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 333 971 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 monoclonales anti-CD40 antagonistas y procedimientos para su uso.

5 Campo de la invención

La invención se refiere a anticuerpos humanos capaces de unirse a CD40, procedimientos para usar los anticuerpos y procedimientos para tratar enfermedades mediadas por la estimulación de señales CD40 en células que expresan CD40.

10 Antecedentes de la invención

Las células B desempeñan un papel importante durante la respuesta inmune normal *in vivo*. Un antígeno extraño se unirá a inmunoglobulinas de superficie en células B específicas, provocando una cadena de acontecimientos que incluyen la endocitosis, el procesamiento, la presentación de los péptidos procesados en moléculas del MHC de clase II y la regulación ascendente del antígeno B7 en la superficie de las células B. A continuación, una célula T específica se une a la célula B por vía del reconocimiento por el receptor de células T (TCR) del antígeno procesado presentado en la molécula del MHC de clase II. La estimulación a través del TCR activa la célula T e inicia la producción de citocinas de célula T. La interacción entre el antígeno CD28 en células T y el antígeno B7 en células B puede proporcionar una segunda señal que activa más la célula T. Cuando se reciben las señales mencionadas anteriormente, el ligando de CD40 (CD40L o CD154), que no se expresa en las restantes células T humanas, es regulado de manera ascendente en la superficie de la célula T. La unión del ligando de CD40 al antígeno CD40 en la superficie de la célula B estimula la célula B, causando la maduración de la célula B a una célula plasmática que secreta altos niveles de inmunoglobulina soluble.

El antígeno CD40 es un antígeno de superficie celular de 55 kDa presente en la superficie de las células B normales y células B neoplásicas humanas, células dendríticas, células presentadoras de antígenos (APC), células endoteliales, células monocíticas y epiteliales. Las células transformadas de pacientes con linfomas de células B de bajo y alto grado, leucemia linfoblástica aguda de células B, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica y enfermedad de Hodgkin expresan el antígeno CD40. La expresión de CD40 también se detecta en dos tercios de los casos de leucemia mieloblástica aguda y en 50% de los linfomas relacionados con el SIDA. Las células B neoplásicas de diversos tumores de linaje de células B expresan un alto grado de CD40 y parecen depender de la señal de CD40 para la supervivencia y proliferación.

Los linfomas inmunoblásticos de células B con frecuencia aparecen en individuos inmunocomprometidos tales como los receptores de aloinjertos y otros que reciben terapia inmunosupresora durante períodos prolongados, pacientes con SIDA, y pacientes con síndromes de inmunodeficiencia primaria tales como el síndrome linfoproliferativo asociado a X o el síndrome de Wiscott-Aldrich (Thomas y col. (1991) *Adv. Cancer Res.* 57:329; Straus y col. (1993) *Ann. Intern. Med.* 118:45).

El antígeno CD40 está relacionado con el receptor del factor de crecimiento de los nervios (NGF) humano, el receptor del factor de necrosis tumoral α (TNF- α), y Fas, sugiriendo que CD40 es un receptor para un ligando con funciones importantes en la activación de las células B. La expresión de CD40 en las APC desempeña una función coestimuladora importante en la activación de linfocitos T ayudantes y linfocitos T citotóxicos. El receptor de CD40 se expresa en células T activadas, plaquetas activadas y en células de músculo liso vascular inflamadas. Los receptores de CD40 pueden encontrarse también en eosinófilos, membranas sinoviales en la artritis reumatoide, en fibroblastos dérmicos y en otras células no linfoides. La unión de CD40 al receptor de CD40 estimula la proliferación y diferenciación de las células B, la producción de anticuerpos, el cambio de isotipo y la generación de memoria de células B.

Los documentos WO 01/83755 y WO 02/28904 describen anticuerpos capaces de unirse a CD40, procedimientos para producir estos anticuerpos y procedimientos para su uso.

Ellmark y col. (*Immunology* 2002, 106, 456-463) dan un informe sobre la modulación de la interacción CD40-ligando de CD40 usando fragmentos de anticuerpos anti CD40 de cadena simple humanos.

Breve resumen de la invención

La invención proporciona un anticuerpo monoclonal humano que es capaz de unirse específicamente al antígeno CD40 humano expresado en la superficie de células que expresan CD40 humano, estando dicho anticuerpo monoclonal exento de actividad agonista significativa, por lo que, cuando dicho anticuerpo monoclonal se une al antígeno CD40 expresado en la superficie de dicha célula, el crecimiento o la diferenciación de dicha célula se inhibe, seleccionándose dicho anticuerpo del grupo constituido por:

a) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 o al anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543;

ES 2 333 971 T3

b) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de CD40 humano que se muestra en SEC ID N° 10 ó SEC ID N° 12;

5 c) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia de CD40 humano que se muestra en SEC ID N° 10 ó SEC ID N° 12; y

10 d) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 o el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543 en un ensayo de unión competitiva.

La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo monoclonal de cualquier reivindicación anterior.

15 La invención también proporciona una línea celular de hibridoma capaz de producir un anticuerpo monoclonal de la invención.

20 La invención también proporciona el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 de la invención en la fabricación de un medicamento para inhibir el crecimiento o la diferenciación de una célula B humana normal.

La invención también proporciona un procedimiento *in vitro* para inhibir el crecimiento o la diferenciación de una célula B humana normal que comprende poner en contacto dicha célula B con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 de la invención.

25 La invención también proporciona el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 de la invención en la fabricación de un medicamento para inhibir la proliferación de una célula B humana normal, en el que dicha proliferación es aumentada por la interacción de un ligando de CD40 con un antígeno CD40 expresado en la superficie de dicha célula B.

30 La invención también proporciona un procedimiento *in vitro* para inhibir la proliferación de una célula B humana normal, en el que dicha proliferación es aumentada por la interacción de un ligando de CD40 con un antígeno CD40 expresado en la superficie de dicha célula B, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto dicha célula B con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 de la invención.

35 La invención también proporciona el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 o uno de sus fragmentos de la invención en la fabricación de un medicamento para inhibir la producción de anticuerpos por células B en un paciente humano.

40 La invención también proporciona el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 de la invención en la fabricación de un medicamento para inhibir el crecimiento de células cancerosas de linaje de células B.

45 La invención también proporciona un procedimiento *in vitro* para inhibir el crecimiento de células cancerosas de linaje de células B, que comprende poner en contacto dichas células cancerosas con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 de la invención.

La invención también proporciona el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 de la invención en la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer caracterizado por la expresión de CD40.

50 La invención también proporciona el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 de la invención en la fabricación de un medicamento para inhibir una ruta de señalización de CD40 mediada por ligandos de CD40 en una célula humana que expresa CD40.

55 La invención también proporciona un procedimiento *in vitro* para inhibir una ruta de señalización de CD40 mediada por ligandos de CD40 en una célula humana que expresa CD40, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto dicha célula con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 de la invención.

60 La invención también proporciona un procedimiento *in vitro* para identificar un anticuerpo que tiene actividad antagonista hacia las células que expresan CD40, que comprende llevar a cabo un ensayo de unión competitiva con un anticuerpo monoclonal de la invención.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti CD40 de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

65 Otros aspectos de la invención se presentan en las reivindicaciones adjuntas.

Los aspectos de la siguiente descripción que no se refieren específicamente a la invención reivindicada son para comparación e ilustración.

Breve resumen de la descripción

Se dan a conocer composiciones y procedimientos para tratar enfermedades mediadas por la estimulación de la señal de CD40 en las células que expresan CD40, incluidos los linfomas, las enfermedades autoinmunes y los rechazos de trasplantes. Las composiciones incluyen anticuerpos monoclonales capaces de unirse a un antígeno CD40 humano ubicado en la superficie de una célula humana que expresa CD40, en las que la unión impide el crecimiento o la diferenciación de la célula. Las composiciones también incluyen anticuerpos monoclonales capaces de unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expresado en la superficie de células humanas que expresan CD40, estando dicho anticuerpo monoclonal exento de actividad agonista significativa, en las que la administración de dicho anticuerpo monoclonal da como resultado un volumen del tumor significativamente menor que una concentración similar del anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico IDEC-C2B8 en un modelo de xenoinjerto tumoral estadificado en ratón desnudo usando la línea celular humana de linfoma células B de Daudi. Las composiciones también incluyen fragmentos de unión al antígeno de estos anticuerpos monoclonales, líneas celulares de hibridomas que producen estos anticuerpos y moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican las secuencias de aminoácidos de estos anticuerpos monoclonales. También se dan a conocer en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden estos anticuerpos anti CD40 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se dan a conocer procedimientos para prevenir o para tratar una enfermedad mediada por la estimulación de la señal de CD40, que comprende tratar al paciente con un anticuerpo anti CD40 o uno de sus fragmentos de unión al antígeno que está exento de actividad agonista significativa cuando se une a un antígeno CD40 en una célula humana que expresa CD40. Las enfermedades mediadas por la estimulación de células que expresan CD40 incluyen enfermedades autoinmunes, cánceres y rechazos de injertos de órganos y tejidos. Los linfomas que pueden tratarse o prevenirse por medio de un procedimiento como el dado a conocer en el presente documento incluyen los linfomas no Hodgkin (linfomas de grado alto, linfomas de grado intermedio y linfomas de grado bajo), la enfermedad de Hodgkin, las leucemias linfoblásticas agudas, los mielomas, las leucemias linfocíticas crónicas y las leucemias mieloblásticas.

Las enfermedades autoinmunes particulares contempladas para tratamiento usando los procedimientos dados a conocer en el presente documento incluyen el lupus eritematoso sistémico (SLE), la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, la psoriasis, la púrpura trombocitopénica autoinmune, la esclerosis múltiple, la espondilitis anquilosante, la miastenia gravis y el pénfigo vulgar. Tales anticuerpos podrían usarse también para prevenir el rechazo de injertos de órganos y tejidos al suprimir las respuestas autoinmunes, para tratar linfomas por la privación de la señal de activación de los linfocitos B neoplásicos proporcionada por CD40, y para administrar toxinas a las células que llevan el CD40 de una manera específica.

Se dan a conocer procedimientos para inhibir el crecimiento, la diferenciación y/o la proliferación de las células B humanas y para inhibir la producción de anticuerpos por las células B en un paciente humano, como así también los procedimientos para inhibir el crecimiento de las células cancerosas de un linaje de células B. También se dan a conocer procedimientos para identificar anticuerpos que tienen actividad antagonista hacia las células que expresan CD40.

Los anticuerpos monoclonales dados a conocer en el presente documento tienen una fuerte afinidad por CD40 y se caracterizan por tener una constante de equilibrio de disociación (K_D) de al menos 10^{-6} M, de preferencia al menos 10^{-7} M hasta aproximadamente 10^{-8} M, de más preferencia al menos aproximadamente 10^{-8} M hasta aproximadamente 10^{-12} M. Los anticuerpos monoclonales y sus fragmentos de unión al antígeno que son adecuados para uso en los procedimientos dados a conocer en el presente documento son capaces de unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expresado en la superficie de una célula humana. Están exentos de actividad agonista significativa pero exhiben actividad antagonista cuando se unen al antígeno CD40 en las células humanas. En una forma de realización, el anticuerpo anti CD40 o su fragmento exhibe actividad antagonista cuando se une al antígeno CD40 en células B humanas normales. En otra forma de realización, el anticuerpo anti CD40 o su fragmento exhibe actividad antagonista cuando se une al antígeno CD40 en células B neoplásicas humanas. Los anticuerpos monoclonales adecuados tienen regiones humanas constantes; de preferencia tienen también regiones del marco total o parcialmente humanizadas; y de mayor preferencia son anticuerpos completamente humanos o sus fragmentos de unión al antígeno. Los ejemplos de tales anticuerpos monoclonales son los anticuerpos denominados en el presente documento como CHIR-5.9 y CHIR-12.12; los anticuerpos monoclonales producidos por las líneas celulares de hibridoma denominadas en el presente documento como 131.2F8.5.9 (a la que se hace referencia en el presente documento línea celular 5.9) y 153.8E2.D10.D6.12.12 (a la que se hace referencia en el presente documento línea celular 12.12); un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia mostrada en SEC ID N° 6, la secuencia mostrada en SEC ID N° 7; la secuencia mostrada en SEC ID N° 8, las secuencias mostradas en SEC ID N° 6 y SEC ID N° 7, y las secuencias mostradas en SEC ID N° 6 y SEC ID N° 8; un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia mostrada en SEC ID N° 2, la secuencia mostrada en SEC ID N° 4, la secuencia mostrada en SEC ID N° 5, las secuencias mostradas SEC ID N° 2 y SEC ID N° 4, y las secuencias mostradas SEC ID N° 2 y SEC ID N° 5; un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia mostrada en SEC ID N° 1, la secuencia mostrada en SEC ID N° 3, y las secuencias mostradas en SEC ID N° 1 y SEC ID N° 3; y los fragmentos de estos anticuerpos monoclonales que se unen al antígeno que retienen la capacidad de unirse específicamente al CD40 humano, y que están exentos de actividad agonista significativa pero que exhiben actividad antagonista cuando se unen al antígeno CD40 en las células humanas. Los ejemplos de tales anticuerpos monoclonales también incluyen un anticuerpo monoclonal

que se une a un epítopo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 12.12; un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo que comprende los residuos con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitiva; y un anticuerpo monoclonal que es un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o cualquiera de los anteriores anticuerpos monoclonales, donde el fragmento tiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno CD40 humano. Los expertos en la técnica reconocen que los anticuerpos antagonistas y los fragmentos de estos anticuerpos que se unen al antígeno dados a conocer en el presente documento incluyen anticuerpos y sus fragmentos de unión al antígeno que son producidos de manera recombinante usando procedimientos bien conocidos en la técnica y que se describen en el presente documento a continuación, e incluyen, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 que se han producido de manera recombinante.

En una forma de realización dada a conocer en el presente documento, los procedimientos de tratamiento comprenden administrar a un paciente una dosis terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende anticuerpos antagonistas anti CD40 adecuados o sus fragmentos de unión al antígeno. Una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 o su fragmento está en el intervalo desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 40 mg/kg, desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 25 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg, desde aproximadamente 5 mg/kg hasta aproximadamente 15 mg/kg, o desde aproximadamente 7 mg/kg hasta aproximadamente 12 mg/kg. Se reconoce que el procedimiento de tratamiento puede comprender una administración única de una dosis terapéuticamente eficaz o múltiples administraciones de una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo antagonista anti CD40 o sus fragmentos de unión al antígeno.

Los anticuerpos antagonistas anti CD40 identificados en el presente documento como adecuados para uso en los procedimientos dados a conocer en el presente documento pueden modificarse. Las modificaciones de estos anticuerpos antagonistas anti CD40 incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti CD40 quiméricos inmunológicamente activos, anticuerpos anti CD40 humanizados y anticuerpos anti CD40 murinos inmunológicamente activos.

30 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la unión de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 al antígeno CD40 en la superficie de línea celular de linfoma (Ramos).

Las Figuras 2A y 2B ilustran las propiedades de unión de los anticuerpos monoclonales anti CD40 CHIR-5.9 y CHIR-12.12 con respecto al ligando de CD40. La Figura 2A muestra que la unión de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 a la superficie de la célula impide la posterior unión del ligando de CD40. La Figura 2B muestra que los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 pueden competir con la unión previa del ligando de CD40 al CD40 de la superficie celular.

Las Figuras 3A y 3B muestran la actividad ADCC de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 candidatos frente a células cancerosas de los ganglios linfáticos de pacientes con linfoma no Hodgkin (NHL). En este ensayo se usaron células NK enriquecidas de un donador voluntario normal recién aisladas (Figura 3A) o tras cultivar durante la noche a 37°C (Figura 3B) como células efectoras. Como las células de NHL también expresan CD20, el antígeno diana para rituximab (Rituxan®), la actividad ADCC de los anticuerpos monoclonales (mAbs) candidatos se comparó con la de rituximab.

La Figura 4 demuestra la actividad antitumoral *in vivo* de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 comparada con la de rituximab usando un modelo de xenoinjerto no estadificado de células B de linfoma en ratón desnudo (Namalwa).

La Figura 5 demuestra la actividad antitumoral *in vivo* de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 comparada con la de ofrituximab usando un modelo de xenoinjerto no estadificado de células B de linfoma en ratón desnudo (Daudi). RC, resistencia al desafío tumoral.

La Figura 6 demuestra la actividad antitumoral *in vivo* de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 comparada con la de rituximab usando un modelo de xenoinjerto estadificado de células B de linfoma en ratón desnudo (Daudi). CR, regresión completa.

La Figura 7 muestra el protocolo usado para determinar el número de moléculas de CD20 y CD40 en las células Namalwa y Daudi.

La Figura 8 muestra la ADCC comparativa del mAb CHIR-12.12 y rituximab frente a las células de linfoma Daudi.

La Figura 9 presenta las secuencias de aminoácidos para las cadenas ligeras y pesadas del mAb CHIR-12.12. Las regiones líder (residuos 1-20 de SEC ID N° 2), variable (residuos 21-132 de SEC ID N° 2), y constante (residuos 133-239 de SEC ID N° 2) de la cadena ligera se muestran en la Figura 9A. Las regiones líder (residuos 1-19 de SEC ID N° 4), variable (residuos 20-139 de SEC ID N° 4), y constante (residuos 140-469 de SEC ID N° 4) de la cadena pesada se

ES 2 333 971 T3

muestran en la Figura 9B. La región constante alternativa para la cadena pesada del mAb CHIR-12.12 mostrada en la Figura 9B refleja una sustitución de un residuo alanina por un residuo serina en la posición 153 de SEC ID N° 4. La secuencia completa para esta variante de la cadena pesada del mAb CHIR-12.12 se presenta en SEC ID N° 5.

5 La Figura 10 muestra la secuencia codificadora para la cadena ligera (Figura 10A; SEC ID N° 1) y la cadena pesada (Figura 10B; SEC ID N° 3) para el mAb CHIR-12.12.

10 La Figura 11 presenta las secuencias de aminoácidos para las cadenas ligera y pesada del mAb CHIR-5.9. Las regiones líder (residuos 1-20 de SEC ID N° 6), variable (residuos 21-132 de SEC ID N° 6), y constante (residuos 133-239 de SEC ID N° 6) de la cadena ligera se muestran en la Figura 11A. Las regiones líder (residuos 1-19 de SEC ID N° 7), variable (residuos 20-144 de SEC ID N° 7), y constante (residuos 145-474 de SEC ID N° 7) de la cadena pesada se muestran en la Figura 11B. La región constante alternativa para la cadena pesada del mAb CHIR-5.9 mostrada en la Figura 11B refleja una sustitución de un residuo alanina por un residuo serina en la posición 158 de SEC ID N° 7. La secuencia completa para esta variante de la cadena pesada del mAb CHIR-5.9 se presenta en la SEC ID N° 8.

15 La Figura 12 muestra la secuencia codificadora (Figura 12A; SEC ID N° 9) para la isoforma corta del CD40 humano (secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 12B; SEC ID N° 10), y la secuencia codificadora (Figura 12C; SEC ID N° 11) para la isoforma larga del CD40 humano (secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 12D).

20 La Figura 13 muestra la temperatura de fusión de CHIR-12.12 en formulaciones de diferente pH medidas por calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Descripción detallada

25 “Tumor”, según se usa en el presente documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, sea maligno o benigno, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

30 Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a, o describen, la afección fisiológica en mamíferos que está típicamente caracterizada por el crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, linfoma y leucemia.

35 Los “anticuerpos” y las “inmunoglobulinas” (Igs) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos exhiben especificidad de unión para un antígeno, las inmunoglobulinas incluyen tanto a los anticuerpos como a otras moléculas análogas a anticuerpos que carecen de especificidad de antígeno. Los polipéptidos del último tipo son producidos, por ejemplo, en niveles bajos por el sistema linfático y en niveles aumentados por los mielomas.

40 El término “anticuerpo” se usa en el sentido más amplio y abarca los anticuerpos totalmente estructurados, fragmentos de anticuerpos que pueden unirse al antígeno (por ejemplo, Fab’, F’(ab)₂, Fv, anticuerpos de cadena simple, fragmentos divalentes o diabodies), y péptidos recombinantes que comprenden los anteriores.

45 El término “anticuerpo monoclonal” según se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones que se dan en la naturaleza que pueden estar presentes en cantidades menores.

50 Los “anticuerpos nativos” y las “inmunoglobulinas nativas” son usualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena ligera y pesada también tiene enlaces disulfuro intracadena espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido por un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio de variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de las cadenas ligera y pesada.

60 El término “variable” se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren ampliamente en secuencia entre los anticuerpos y se utilizan en la unión y la especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos llamados regiones determinantes de complementariedad (CDR) o regiones hipervariables tanto en los dominios de las cadenas ligeras como de las cadenas pesadas. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones de marco (FR). Los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración lámina β , conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan la estructura de la lámina β , y en algunos casos forman parte de la misma. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión del antígeno de los anticuerpos (véase Kabat y col. (1991) NIH Publ. N° 91-3242, Vol. I, páginas 647-669).

ES 2 333 971 T3

Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras, tales como la unión del receptor de FC (FcR), la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos, la opsonización, la iniciación de la citotoxicidad dependiente del complemento y la desgranulación de los mastocitos.

5 El término “región hipervariable” cuando se usa en el presente documento se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión del antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una “región determinante de complementariedad” o “CDR” (es decir, los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat y col. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (5th ed., Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD) y/o los residuos de un “bucle hipervariable” (es decir, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32(H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Clothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917). Los residuos del “marco” o “FR” son los residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable.

15 Los “fragmentos de anticuerpos” comprenden una parte de un anticuerpo intacto, de preferencia la región de unión al anticuerpo o la región variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')₂ y fragmentos Fv; fragmentos divalentes; anticuerpos lineales (Zapata y col. (1995) Protein Eng. 8(10): 1057-1062); moléculas de anticuerpos de cadena simple; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, llamados fragmentos “Fab”, cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento residual “Fc”, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina da un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación con el antígeno y aún es capaz de formar un entrecruzamiento con el antígeno.

25 “Fv” es el fragmento mínimo del anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento y unión del antígeno completo. En una especie Fv de dos cadenas, esta región está constituida por un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en estrecha asociación, no covalente. En una especie Fv de cadena única, un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera pueden estar unidos covalentemente por un conector peptídico flexible tal que las cadenas ligera y pesada pueden asociarse en una estructura “dimérica” análoga a la de una especie Fv de dos cadenas. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. En conjunto, las seis CDR confieren la especificidad de unión al antígeno para el anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una menor afinidad que el sitio de unión completo.

35 El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (C_{H1}) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi terminal del dominio C_{H1} de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región de bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en el presente documento para el Fab' en el que el(los) residuo(s) cisteína de los dominios constantes tiene(n) un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ se producían originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

45 Las “cadenas ligeras” de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente diferentes, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

50 Según la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas humanas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de estas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de las cadenas pesadas que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras y las configuraciones tridimensionales de las subunidades de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Los isotipos diferentes tienen funciones efectoras diferentes. Por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG3 humanos median la actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC).

60 La palabra “marcador” cuando se utiliza en el presente documento se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directamente o indirectamente a los anticuerpos para generar un anticuerpo “marcado”. El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable. Los radionúclidos que pueden servir como marcadores detectables incluyen, por ejemplo, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212 y Pd-109. El marcador puede también ser una entidad no detectable tal como una toxina.

65 El término “antagonista” se utiliza en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que bloquea parcial o totalmente, inhibe o neutraliza una actividad biológica de una diana nativa dada a conocer en el presente documento o su transcripción o traducción. “Vehículos” según se usa en el presente documento incluye los vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables, que son no tóxicos para la célula o el mamífero que se expone al

mismo en las dosis y concentraciones utilizadas. Frecuentemente el vehículo fisiológicamente aceptable es una disolución acuosa de pH tamponado. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato, succinato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluido el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (con menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluidos glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como el sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN, polietilenglicol (PEG) y Pluronic. La administración “en combinación con” otro u otros agentes terapéuticos incluye la administración simultánea (al mismo tiempo) y la administración consecutiva en cualquier orden.

Una “célula huésped”, según se usa en el presente documento, se refiere a un microorganismo o a una célula o línea celular de eucariota cultivada como una entidad unicelular que puede usarse, o se ha usado, como receptor de un vector recombinante u otros polinucleótidos de transferencia, e incluye a la progenie de la célula original que se ha transfectado. Se entiende que la progenie de una célula única puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en complemento de ADN genómico o total a la original, por las mutaciones naturales, accidentales o deliberadas.

“Células efectoras humanas” son leucocitos que expresan uno o más FcR y que realizan funciones efectoras. De preferencia, las células expresan al menos Fc γ RIII y llevan a cabo la función efectora de citotoxicidad mediada por células dependiente de antígenos (ADCC). Los ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células citolíticas naturales (NK), monocitos, macrófagos, eosinófilos y neutrófilos, siendo las de preferencia las PBMC y las células NK. Los anticuerpos que tienen actividad ADCC son típicamente del isotipo IgG1 o IgG3. Nótese que además de aislar anticuerpos IgG1 e IgG3, tales anticuerpos que median la ADCC pueden generarse modificando una región variable de un anticuerpo que no media la ADCC o un fragmento de región variable formando una región constante del isotipo IgG1 o IgG3.

Los términos “receptor de Fc” o “FcR” se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR de preferencia es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR de preferencia es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye a los receptores de las subclases Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII, incluidas las variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativas de estos receptores. Los receptores Fc γ RII incluyen Fc γ RIIA (un “receptor activador”) y Fc γ RIIB (un “receptor inhibidor”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplásmicos. El receptor activador Fc γ RIIA contiene un motivo de activación inmuno receptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor Fc γ RIIB contiene un motivo de inhibición inmuno receptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (véase Daeron (1997) *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234). Los FcR se recopilan en Ravetch and Kinet (1991) *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-492 (1991); Capel y col. (1994) *Immunomethods* 4: 25-34; y de Haas y col. (1995) *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-341. Otros FcRs, incluidos los que se identificarán en el futuro, están abarcados por el término “FcR” en el presente documento. El término incluye también el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer y col. (1976) *J. Immunol.* 117: 587 y Kim y col. (1994) *J. Immunol.* 24: 249 (1994)).

Hay varias maneras de producir anticuerpos humanos. Por ejemplo, pueden immortalizarse células secretoras por medio de la infección con el virus de Epstein-Barr (EBV). Sin embargo, las células infectadas con EBV son difíciles de clonar y usualmente producen sólo rendimientos relativamente bajos de inmunoglobulina (James and Bell (1987) *J. Immunol Methods* 100: 5-40). En el futuro, posiblemente podría lograrse la inmortalización de células B humanas mediante la introducción de una combinación definida de genes transformadores. Esa posibilidad se destaca por medio de una reciente demostración de que la expresión de la subunidad catalítica de telomerasa junto con la oncoproteína grande de SV40 y un alelo oncogénico de H-ras dio como resultado la conversión tumorigénica de células fibroblásticas y epiteliales humanas normales (Hahn y col. (1999) *Nature* 400: 464-468). Ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulinas (Jakobovits y col. (1993) *Nature* 362: 255-258; Lonberg and Huszar (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13: 65-93; Fishwild y col. (1996) *Nat. Biotechnol.* 14: 845-851; Mendez y col. (1997) *Nat. Genet.* 15: 146-156; Green (1999) *J. Immunol. Methods* 231: 11-23; Tomizuka y col. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 722-727; recopilado en Little y col. (2000) *Immunol. Today* 21: 364-370). Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota de la región de unión de cadenas pesadas (JH) del anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal da como resultado la inhibición completa de producción de anticuerpos endógenos (Jakobovits y col. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551-2555). La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulinas humanas de línea germinal en tales ratones mutantes de línea germinal da como resultado la producción de anticuerpos humanos tras el desafío con antígenos (Jakobovits y col. (1993) *Nature* 362: 255-258). Mendez y col. (1997) (*Nature Genetics* 15: 146-156) han generado una línea de ratones transgénicos que, cuando se desafían con un antígeno, generan anticuerpos totalmente humanos de alta afinidad. Esto se logró por la integración en la línea germinal de loci megabase de cadenas pesadas y cadenas ligeras humanas en los ratones con delección en el segmento endógeno JH como se describió anteriormente. Estos ratones (tecnología XenoMouse[®] II (Abgenix; Fremont, California)) albergan 1.020 kb del locus de cadena pesada humana que contiene aproximadamente 66 genes de VH, regiones DH y JH completas, y tres regiones constantes diferentes, y también albergan 800 kb del locus κ humano que contiene 32 genes de V κ , segmentos J κ y genes de C κ . Los anticuerpos producidos en estos ratones se asemejan mucho a los que se observan en seres humanos en todos los aspectos, incluidos la reorganización genética, la estructura

ES 2 333 971 T3

y el repertorio. Los anticuerpos humanos se expresan de preferencia sobre anticuerpos endógenos por delección en el segmento endógeno que evita la reorganización genética en el locus murino. Tales ratones pueden inmunizarse con un antígeno de interés particular.

5 Los sueros de tales animales inmunizados pueden seleccionarse para reactividad de anticuerpo frente al antígeno inicial. Los linfocitos pueden aislarse de ganglios linfáticos o de células del bazo y además pueden seleccionarse para células B seleccionando las células CD138 negativas y CD19 positivas. En un aspecto, tales cultivos de células B (BCC) pueden fusionarse a células de mieloma para generar hibridomas como se detalló anteriormente.

10 En otro aspecto, tales cultivos de células B pueden seleccionarse además para reactividad frente al antígeno inicial, de preferencia. Tal selección incluye ELISA con la proteína diana/antígeno, un ensayo de competición con anticuerpos conocidos que se unen al antígeno de interés, y unión *in vitro* a células CHO u otras células transfectadas de manera transitoria que expresan el antígeno diana.

15 La presente descripción se refiere a composiciones y procedimientos para el tratamiento de pacientes humanos con enfermedades mediadas por la estimulación de la señal de CD40 en células que expresan CD40. Los procedimientos implican el tratamiento con un anticuerpo anti CD40 de la invención, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, en el que la administración del anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno promueve una respuesta terapéutica positiva en el paciente que se somete a este procedimiento de terapia. Los anticuerpos anti CD40 adecuados para uso en los procedimientos de la invención se unen específicamente al antígeno CD40 humano expresado en la superficie de una célula humana y están exentos de actividad agonista significativa, pero exhiben actividad antagonista cuando se unen al antígeno CD40 en una célula humana que expresa CD40. Estos anticuerpos anti CD40 y sus fragmentos de unión al antígeno se denominan en el presente documento anticuerpos anti CD40 antagonistas. Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 totalmente humanos que se describen a continuación y los anticuerpos monoclonales tienen las características de unión de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12. Los expertos en la técnica reconocen que los anticuerpos antagonistas y los fragmentos de estos anticuerpos que se unen al antígeno dados a conocer en el presente documento incluyen anticuerpos y sus fragmentos de unión al antígeno que se producen de manera recombinante utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica y que se describen a continuación en el presente documento, e incluyen, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12, que se han producido de manera recombinante.

20 Los anticuerpos que tienen las características de unión de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 incluyen anticuerpos que interfieren de manera competitiva con la unión a CD40 y/o se unen a los mismos epítopos que CHIR-5.9 y CHIR-12.12. Un experto podría determinar si un anticuerpo interfiere de manera competitiva con CHIR-5.9 o CHIR-12.12 usando procedimientos convencionales.

25 Cuando estos anticuerpos se unen a CD40 expuesto en la superficie de las células humanas, tales como las células B humanas, los anticuerpos están exentos de actividad agonista importante; en algunas formas de realización, su unión a CD40 expuesto en la superficie de las células humanas da como resultado la inhibición de la proliferación y la diferenciación de estas células humanas. Por consiguiente, los anticuerpos anti CD40 antagonistas adecuados para uso en los procedimientos de la invención incluyen los anticuerpos monoclonales que pueden exhibir actividad antagonista hacia las células humanas normales y malignas que expresan el antígeno de superficie celular CD40.

30 En algunas formas de realización, los anticuerpos anti CD40 de la invención exhiben actividad antitumoral aumentada comparado con el anticuerpo monoclonal anti CD20 quimérico IDEC-C2B8, donde la actividad antitumoral se ensaya con cantidades equivalentes de estos anticuerpos en un modelo de xenoinjerto de tumor en ratón desnudo usando líneas celulares de linfoma humanas. IDEC-C2B8 (IDEC Pharmaceuticals Corp., San Diego, California; comercialmente disponible bajo la marca Rituxan[®], también se conoce como rituximab) es un anticuerpo monoclonal anti CD20 quimérico que contiene IgG1 humana y regiones constantes kappa con regiones variables murinas aisladas de un anticuerpo monoclonal anti CD20 murino, IDEC-2B8 (Reff y col. (1994) Blood 83: 435-445). Rituximab[®] está autorizado para el tratamiento de la recaída del linfoma no Hodgkin folicular (NHL) o de grado bajo de células B. El descubrimiento de anticuerpos con actividad antitumoral superior comparado con Rituximab[®] podría mejorar drásticamente los procedimientos de tratamiento del cáncer para los linfomas de células B, en particular el linfoma no Hodgkin de células B.

35 Los modelos de xenoinjerto de tumores en ratón desnudo adecuados incluyen los que utilizan líneas celulares de linfoma de Burkitt humanas conocidas como Namalwa y Daudi. Las formas de realización de preferencia ensayan la actividad antitumoral en un modelo de xenoinjerto de tumor estadificado en ratón desnudo utilizando la línea celular de linfoma humana Daudi, como se describe en el presente documento a continuación en el Ejemplo 17. Un modelo de xenoinjerto de tumor estadificado en ratón desnudo usando la línea celular de linfoma Daudi es más eficaz para distinguir la eficacia terapéutica de un anticuerpo dado que un modelo no estadificado, ya que en el modelo estadificado la dosis de anticuerpos se inicia sólo después de que el tumor haya alcanzado un tamaño que puede medirse. En el modelo no estadificado, la dosis de anticuerpos se inicia, por lo general, en un plazo de aproximadamente 1 día de la inoculación del tumor y antes de que esté presente el tumor palpable. La capacidad de un anticuerpo para superar a Rituxan[®] (es decir, para exhibir actividad antitumoral aumentada) en un modelo estadificado es una fuerte indicación de que el anticuerpo será terapéuticamente más eficaz que Rituxan[®]. Por otra parte, en el modelo de Daudi, anti CD20, la diana de Rituxan[®] se expresa en la superficie celular en un nivel más alto que CD40.

ES 2 333 971 T3

Se entiende por “cantidad equivalente” del anticuerpo anti CD40 de la invención y Rituxan® a la misma dosis de mg que se administra por peso. Por consiguiente, cuando el anticuerpo anti CD40 de la invención se dosifica a 0,01 mg/kg de peso corporal del ratón utilizado en el modelo de tumor, Rituxan® también se dosifica a 0,01 mg/kg de peso corporal del ratón. Asimismo, cuando el anticuerpo anti CD40 de la invención se dosifica a 0,1, 1 ó 10 mg/kg de peso corporal del ratón utilizado en el modelo de tumor, Rituxan® también se dosifica a 0,1, 1 ó 10 mg/kg, respectivamente, de peso corporal del ratón.

Cuando se administran en el modelo de xenoinjerto de tumor en ratón desnudo, algunos anticuerpos de la invención dan como resultado un volumen de tumor significativamente menor que una cantidad equivalente de Rituxan®. Por consiguiente, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 totalmente humano exhibe al menos un 20% de aumento en la actividad antitumoral comparado con la actividad observada con una dosis equivalente de Rituxan cuando se ensaya en el modelo de xenoinjerto tumor estadificado en ratón desnudo usando la línea celular de linfoma humana Daudi de la manera descrita en los Ejemplos a continuación en el presente documento, y puede exhibir tanto como un 50% a 60% de aumento en la actividad antitumoral en este ensayo. Esta actividad antitumoral aumentada se refleja en la mayor reducción en el volumen del tumor observada con el anticuerpo anti CD40 de la invención comparado con la dosis equivalente de Rituxan®. Por consiguiente, por ejemplo, dependiendo del tiempo después de la inoculación del tumor, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 puede exhibir un volumen de tumor que es aproximadamente un tercio hasta aproximadamente la mitad del observado para una dosis equivalente de Rituxan®.

Otra diferencia en la eficacia del anticuerpo es la medición *in vitro* de la concentración de anticuerpo necesaria para obtener la máxima lisis de células tumorales *in vitro* en presencia de células NK. Por ejemplo, los anticuerpos anti CD40 de la invención alcanzan una lisis máxima de células Daudi a una CE50 inferior a 1/2, y de preferencia 1/4, y de más preferencia 1/10 de la concentración de Rituxan®.

Además del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12, otros anticuerpos anti CD40 que podrían compartir las características de tener eficacia significativamente mayor que cantidades equivalentes de Rituxan® en los ensayos descritos anteriormente incluyen, pero no se limitan a: (1) el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 12.12; (2) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia en SEC ID N° 2, la secuencia en SEC ID N° 4, la secuencia en SEC ID N° 5, las secuencias en SEC ID N° 2 y SEC ID N° 4, y las secuencias en SEC ID N° 2 y SEC ID N° 5; (3) un anticuerpo monoclonal que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia de nucleótidos en SEC ID N° 1, la secuencia de nucleótidos en SEC ID N° 3, y las secuencias en SEC ID N° 1 y SEC ID N° 3; (4) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unir el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 12.12; (5) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de aminoácidos en SEC ID N° 10 ó SEC ID N° 12; (6) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitiva; y (7) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que se une al anticuerpo o los anteriores anticuerpos monoclonales en los puntos anteriores (1)-(6), en los que el fragmento retiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno CD40 humano.

Anticuerpos anti CD40 antagonistas

Los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 representan anticuerpos anti CD40 antagonistas adecuados para uso en los procedimientos de la presente invención. Los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 son anticuerpos monoclonales anti CD40 totalmente humanos del isotipo IgG1 producidos a partir de las líneas celulares de hibridoma 131.2F8.5.9 (a la que se hace referencia en el presente documento como la línea celular 5.9) y 153.8E2.D10.D6.12.12 (a la que se hace referencia en el presente documento como la línea celular 12.12). Estas líneas celulares se crearon usando esplenocitos de ratones xenotípicos inmunizados que contienen el locus de cadena pesada de IgG1 humana y el locus de cadena κ humana (tecnología XenoMouse®; Abgenix; Fremont, California). Las células del bazo se fusionaron con las células de mieloma SP2/0 de ratón (Sierra BioSource). Las hibridomas resultantes se subclonaron varias veces para crear las líneas celulares monoclonales estables 5.9 y 12.12. Otros anticuerpos de la invención pueden prepararse de manera similar usando ratones transgénicos para loci de inmunoglobulina humana o por otros procedimientos conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento.

Se dan a conocer las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las regiones variables del anticuerpo CHIR-12.12 y las secuencias de aminoácidos de las regiones variables del anticuerpo CHIR-5.9. Más particularmente, las secuencias de aminoácidos para las regiones líder, variable y constante para la cadena ligera y cadena pesada para el mAb CHIR-12.12 se presentan en las Figuras 9A y 9B, respectivamente. Véase también SEC ID N° 2 (secuencia completa para la cadena ligera del mAb CHIR-12.12), SEC ID N° 4 (secuencia completa para la cadena pesada para el mAb CHIR-12.12) y SEC ID N° 5 (secuencia completa para una variante de la cadena pesada para el mAb CHIR-12.12 presentada en SEC ID N° 4, donde la variante comprende una sustitución del residuo alanina por serina en la posición de 153 de SEC ID N° 4). Las secuencias de nucleótidos que codifican la cadena ligera y la cadena pesada para el mAb CHIR-12.12 se presentan en las Figuras 11A y 11B, respectivamente. Véase también SEC ID N° 1 (secuencia codificadora para la cadena ligera para el mAb CHIR-12.12) y SEC ID N° 3 (secuencia codificadora para la cadena pesada para el mAb CHIR-12.12). Las secuencias de aminoácidos para las regiones líder, variable y constante para la cadena ligera y cadena pesada del mAb CHIR-5.9 se presentan en las Figuras 10A y 10B, respectivamente. Véase también SEC ID N° 6 (secuencia completa para la cadena ligera del mAb CHR-5.9), SEC ID N° 7 (secuencia completa

ES 2 333 971 T3

para la cadena pesada del mAb CHIR-5.9) y SEC ID N° 8 (secuencia completa para una variante de la cadena pesada del mAb CHIR-5.9 presentada en SEC ID N° 7, donde la variante comprende una sustitución del residuo alanina por serina en la posición de 158 de SEC ID N° 7). Además, los hibridomas que expresan los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 se han depositado en la ATCC con una denominación de depósito de patente de PTA-5542 y PTA-5543, respectivamente.

Además de la actividad antagonista, resulta de preferencia que los anticuerpos anti CD40 de esta invención tengan otro mecanismo de acción contra una célula tumoral. Por ejemplo, los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 nativos tienen actividad ADCC. Como alternativa, las regiones variables de los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 pueden expresarse en otro isotipo de anticuerpos que tenga actividad ADCC. También es posible conjugar formas nativas, formas recombinantes o fragmentos de CHR-5.9 o CHIR-12.12 que se unen al antígeno a una citotoxina, un agente terapéutico, o a un ion metálico radiactivo o radioisótopo, como se señala a continuación en el presente documento.

Los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 se unen a CD40 soluble en ensayos de tipo ELISA, evitan la unión del ligando de CD40 al CD40 de la superficie celular, y desplazan el ligando de CD40 previamente unido, según se determina por ensayos de citometría de flujo. Los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 compiten uno con el otro por la unión a CD40 pero no con 15B8, el anticuerpo monoclonal anti CD40 descrito en el documento WO 02/28904. Cuando se prueban *in vitro* los efectos en la proliferación de células B de sujetos humanos normales, CHIR-5.9 y CHIR-12.12 actúan como anticuerpos anti CD40 antagonistas. Además, CHIR-5.9 y CHIR-12.12 no inducen fuerte proliferación de linfocitos humanos de sujetos normales. Estos anticuerpos son capaces de matar las células diana que expresan CD40 por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). La afinidad de unión de CHIR-5.9 por el CD40 humano es de $1,2 \times 10^{-8}$ M y la afinidad de unión de CHIR-12.12 es de 5×10^{-10} M, según se determina por medio del ensayo Biacore™.

Los anticuerpos anti CD40 antagonistas adecuados para uso en los procedimientos de la presente invención exhiben una fuerte afinidad de unión de sitio único por el antígeno CD40 de superficie celular. Los anticuerpos monoclonales de la invención exhiben una constante de equilibrio de disociación (K_D) para CD40 de al menos 10^{-5} M, al menos 3×10^{-5} M, de preferencia al menos 10^{-6} M hasta 10^{-7} M, de más preferencia al menos 10^{-8} M hasta aproximadamente 10^{-12} M, medida usando un ensayo convencional tal como Biacore™. El análisis Biacore se conoce en la técnica y se proporcionan detalles en el "BIAapplications handbook". Los procedimientos descritos en el documento WO 01/27160 pueden usarse para modular la afinidad de unión.

Se entiende por "antígeno CD40", "antígeno CD40 de superficie celular", "receptor de CD40" o "CD40" una glicoproteína transmembranaria que pertenece a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) (véase, por ejemplo las Patentes de EEUU N° 5.674.492 y 4.708.871; Stamenkovic y col. (1989) EMBO 8: 1403; Clark (1990) Tissue Antigens 36: 33; Barclay y col. (1997) The Leucocyte Antigen Facts Book (2ª ed.; Academic Press, San Diego)). Se han identificado dos isoformas de CD40 humano, codificadas por variantes de transcripción con cortes y empalmes alternativos de este gen. La primera isoforma (también conocida como la "isoforma larga" o "isoforma 1") se expresa como un polipéptido precursor de 277 aminoácidos (SEC ID N° 12 (informada primero en GenBank con N° de acceso CAA43045, e identificada como isoforma 1 en GenBank con N° de acceso NP 001241), codificado por SEC ID N° 11 (véase N° de acceso de GenBank X60592 y NM 001250)), que tiene una secuencia señal representada por los primeros 19 residuos. La segunda isoforma (también conocida como la "isoforma corta" o "isoforma 2") se expresa como un polipéptido precursor de 203 aminoácidos (SEC ID N° 10 (N° de acceso de GenBank NP 690593), codificado por SEC ID N° 9 (N° de acceso de GenBank NM 152854)), que también tiene una secuencia señal representada por los primeros 19 residuos. Los polipéptidos precursores de estas dos isoformas de CD40 humano comparten en común sus primeros 165 residuos (es decir, los residuos 1-165 de SEC ID N° 10 y SEC ID N° 12). El polipéptido precursor de la isoforma corta (mostrado en SEC ID N° 10) está codificado por una variante de transcripción (SEC ID N° 9) que carece de un segmento codificador, que da lugar a un cambio del marco de traducción; la isoforma de CD40 resultante contiene un extremo C terminal más corto y diferente (residuos 166-203 de SEC ID N° 10) del que está contenido en la isoforma larga de CD40 (extremo C terminal mostrado en los residuos 166-277 de SEC ID N° 12). Para los fines de la presente invención, el término "antígeno CD40", "antígeno CD40 de superficie celular", "receptor de CD40" o "CD40" abarca tanto la isoforma corta como la larga de CD40. Los anticuerpos anti CD40 de la presente invención se unen a un epítipo de CD40 humano que se encuentra en la misma situación dentro de la isoforma corta o la isoforma larga de este antígeno de superficie celular como se señala a continuación en el presente documento.

El antígeno CD40 está expuesto en la superficie de una diversidad de tipos celulares, según se describe en otras partes en el presente documento. Por "expuesto en la superficie" y "expresado en la superficie" se entiende que todo o una parte del antígeno CD40 está expuesto al exterior de la célula. El antígeno CD40 expuesto o expresado puede estar total o parcialmente glicosilado.

Por "actividad agonista" se entiende que la sustancia funciona como un agonista. Un agonista se combina con un receptor en una célula e inicia una reacción o actividad que es similar a la misma que se inicia por el ligando natural del receptor. Un agonista de CD40 induce, pero no se limita a, cualquiera o todas las siguientes respuestas: proliferación y diferenciación de células B, producción de anticuerpos, adhesión intercelular, generación de memoria de células B, cambio de isotipo, regulación ascendente de la expresión en la superficie celular de MHC clase II y CD80/86, y secreción de citocinas proinflamatorias tales como IL-8, IL-12 y TNF. Por "actividad antagonista" se entiende que la sustancia funciona como un antagonista. Un antagonista de CD40 evita o reduce la inducción de cualquiera de las respuestas inducidas por la unión del receptor de CD40 a un ligando agonista, en particular CD40L. El antagonista

puede reducir la inducción de una o más de las respuestas a la unión de agonistas en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, de preferencia 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, de más preferencia 70%, 80%, 85% y de mayor preferencia 90%, 95%, 99% ó 100%. Los procedimientos para medir la especificidad de unión y la actividad de antagonista de anticuerpos anti CD40 y ligandos de CD40 son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, ensayos de unión competitiva convencionales, ensayos para controlar la secreción de inmunoglobulinas por las células B, ensayos de proliferación de células B, ensayos de proliferación de células B análogos a Banchereau, ensayos de células T ayudantes para la producción de anticuerpos, ensayos de proliferación de células B con coestimulación y ensayos para regulación ascendente de marcadores de activación de células B. Véase, por ejemplo, los ensayos dados a conocer en el documento WO 00/75348 y en la Patente de EEUU N° 6.087.329.

Por actividad antagonista “significativa” se entiende una actividad agonista de al menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ó 100% superior a la actividad agonista inducida por una sustancia neutra o un control negativo según se mide en el ensayo de una respuesta de células B. De preferencia, la actividad agonista “significativa” es una actividad agonista que es al menos 2 veces mayor o al menos 3 veces mayor que la actividad agonista inducida por una sustancia neutra o un control negativo según se mide en el ensayo de una respuesta de células B. Por consiguiente, por ejemplo, cuando la respuesta de células B de interés es la proliferación de células B, la actividad agonista “significativa” sería la inducción de un nivel de proliferación de células B que es al menos 2 veces mayor o al menos 3 veces mayor que el nivel de proliferación de células B inducido por una sustancia neutra o un control negativo. En una forma de realización, una inmunoglobulina no específica, por ejemplo IgG1, que no se une a CD40 sirve como el control negativo. Una sustancia “exenta de actividad agonista significativa” exhibirá una actividad agonista de no más que aproximadamente 25% mayor que la actividad agonista inducida por una sustancia neutra o un control negativo, de preferencia no más que aproximadamente 20% mayor, 15% mayor, 10% mayor, 5% mayor, 1% mayor, 0.5% mayor, o incluso no más que aproximadamente 0,1% mayor que la actividad agonista inducida por una sustancia neutra o un control negativo según se mide en un ensayo de una respuesta de células B. Los anticuerpos anti CD40 antagonistas útiles en los procedimientos de la presente invención están exentos de actividad agonista significativa como se señaló anteriormente cuando se unen a un antígeno CD40 en una célula humana. En una forma de realización de la invención, el anticuerpo anti CD40 antagonista está exento de actividad agonista significativa en una respuesta de células B. En otra forma de realización de la invención, el anticuerpo anti CD40 antagonista está exento de actividad agonista significativa en ensayos de más de una respuesta de células B (por ejemplo, proliferación y diferenciación, o proliferación, diferenciación y producción de anticuerpos).

Según se utiliza en el presente documento “anticuerpo anti CD40” abarca cualquier anticuerpo que reconoce específicamente el antígeno CD40 de superficie celular, incluidos anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos de cadena única, y sus fragmentos tales como Fab, F(ab')₂, F_v, y otros fragmentos que retienen la función de unión al antígeno del anticuerpo anti CD40 original. Son de particular interés para la presente invención los anticuerpos anti CD40 antagonistas dados a conocer en el presente documento que comparten las características de unión de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos anteriormente. Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: (1) los anticuerpos monoclonales producidos por las líneas celulares de hibridoma denominadas 131.2F8.5.9 (a la que se hace referencia en el presente documento como línea celular 5.9) y 153.8E2.D10.D6.12.12 (a la que se hace referencia en el presente documento como línea celular 12.12), depositadas en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 y Depósito de Patente N° PTA-5543, respectivamente; (2) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia mostrada en SEC ID N° 2, la secuencia mostrada en SEC ID N° 4, la secuencia mostrada en SEC ID N° 5, las secuencias mostradas en SEC ID N° 2 y SEC ID N° 4, y por las secuencias mostradas en SEC ID N° 2 y SEC ID N° 5; (3) un anticuerpo monoclonal que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia mostrada en SEC ID N° 6, la secuencia mostrada en SEC ID N° 7, la secuencia mostrada en SEC ID N° 8, las secuencias mostradas en SEC ID NO:6 y SEC ID N° 7, y por las secuencias mostradas en SEC ID N° 6 y SEC ID N° 8; (4) un anticuerpo monoclonal que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID N° 1, la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID N° 3, y las secuencias de nucleótidos mostradas en SEC ID N° y SEC ID N° 3; (5) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 5.9 o la línea celular de hibridoma 12.12; (6) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 10 o SEC ID N° 12; (7) un anticuerpo monoclonal que compete con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitiva; y (8) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 que se une al antígeno o los anticuerpos monoclonales anteriores en los puntos anteriores (1)-(7), en los que el fragmento retiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno CD40 humano.

60 *Producción de anticuerpos anti CD40 antagonistas*

Los anticuerpos anti CD40 antagonistas dados a conocer en el presente documento y para uso en los procedimientos de la presente invención pueden producirse mediante cualquier procedimiento de producción de anticuerpos conocido por los expertos en la técnica. Por consiguiente, pueden prepararse sueros policlonales por medio de procedimientos convencionales. En general, primero se utiliza una disolución que contiene el antígeno CD40 para inmunizar a un animal adecuado, de preferencia un ratón, rata, conejo o cabra. Los conejos o cabras son de preferencia para la preparación de sueros policlonales por el volumen de suero que puede obtenerse y la disponibilidad de anticuerpos anti conejo y anti cabra marcados.

Pueden prepararse sueros policlonales en un animal transgénico, de preferencia un ratón que lleva loci de inmunoglobulina humana. En una forma de realización de preferencia, se usan células Sf9 que expresan CD40 como el inmunógeno. La inmunización también puede llevarse a cabo mezclando o emulsionando la disolución que contiene el antígeno en disolución salina, de preferencia en un adyuvante tal como el adyuvante completo de Freund, e inyectando por vía intravenosa la mezcla o emulsión por vía parenteral (generalmente por vía subcutánea o intramuscular). Típicamente es suficiente una dosis de 50-200 µg/inyección. La inmunización se estimula por lo general 2-6 semanas más tarde con una o más inyecciones de la proteína en disolución salina, de preferencia usando adyuvante incompleto de Freund. Como alternativa, pueden también generarse anticuerpos mediante inmunización *in vitro* usando procedimientos conocidos en la técnica, que para los fines de esta invención se considera equivalente a la inmunización *in vivo*. Los antisueros policlonales se obtienen por extracción de sangre de los animales inmunizados en un recipiente de vidrio o de plástico, incubando la sangre a 25°C durante una hora, seguido por la incubación a 4°C durante 2-18 horas. El suero se recupera por centrifugación (por ejemplo, 1.000 g x durante 10 minutos). Pueden obtenerse aproximadamente 20-50 ml por extracción de sangre de conejos...

La producción de células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) se da a conocer en la Patente de EEUU N° 6.004.552. En resumen, se combinaron secuencias que codifican CD40 humano en un baculovirus usando vectores de transferencia. Los plásmidos se cotransfectaron con ADN de baculovirus de tipo silvestre en células Sf9. Las células Sf9 infectadas con baculovirus recombinante se identificaron y se purificaron como clones.

De preferencia el anticuerpo es monoclonal en la naturaleza. Por “anticuerpo monoclonal” se entiende un anticuerpo obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que se presentan naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. El término no está limitado con respecto a la especie o la fuente del anticuerpo. El término abarca inmunoglobulinas completas, así como fragmentos tales como Fab, F(ab')₂, Fv y otros que retienen la función de unión al antígeno del anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico, es decir, el antígeno CD40 de superficie celular en la presente invención. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo ya que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que es necesaria la producción del anticuerpo por ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilizan según la presente invención pueden obtenerse por el procedimiento de hibridomas descrito por primera vez por Kohler y col. (1975) Nature 256: 495, o pueden producirse por los procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Patente de EEUU N° 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” pueden aislarse también de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson y col. (1991) Nature 352: 624-628; Marks y col. (1991) J Mol. Biol. 222: 581-597; y en la Patente de EEUU N° 5.514.548.

Por “epítipo” se entiende la parte de la molécula antigénica para la que se produce un anticuerpo y a la que se unirá el anticuerpo. Los epítopos pueden comprender residuos lineales de aminoácidos (es decir, los residuos en el epítipo están organizados consecutivamente uno después de otro en forma lineal), residuos no lineales (a los que se hace referencia en el presente documento como “epítopos no lineales”; estos epítopos no están organizados de forma consecutiva), o residuos de aminoácidos tanto lineales como no lineales.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando el procedimiento de Kohler y col. (1975) Nature 256: 495-496, o una de sus modificaciones. Típicamente, se inmuniza un ratón con una disolución que contiene el antígeno. La inmunización puede llevarse a cabo mezclando o emulsionando la disolución que contiene el antígeno en disolución salina, de preferencia en un adyuvante tal como el adyuvante completo de Freund, e inyectando la mezcla o emulsión por vía parenteral. Puede usarse cualquier procedimiento de inmunización conocido en la técnica para obtener anticuerpos monoclonales de la invención. Tras la inmunización del animal, se extirpa el bazo (y de manera opcional, varios ganglios linfáticos grandes) y se separan las células individuales. Las células del bazo pueden seleccionarse aplicando una suspensión de células a una placa o pocillo recubierto con el antígeno de interés. Las células B que expresan la inmunoglobulina unida a membrana específica para el antígeno se unen a la placa y no se eliminan por aclarado. A continuación se induce la fusión de las células B resultantes, o de todas las células separadas del bazo, con células de mieloma para formar hibridomas, y se cultivan en un medio selectivo. Las células resultantes se plaquean por dilución en serie y se realiza el ensayo de producción de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno de interés (y que no se unen a antígenos no relacionados). A continuación se cultivan los hibridomas que secretan el anticuerpo monoclonal (mAb) seleccionado *in vitro* (por ejemplo, en frascos de cultivo tisular o reactores de fibras huecas), o *in vivo* (como ascitis en ratones).

Cuando los anticuerpos anti CD40 antagonistas de la invención deben prepararse utilizando procedimientos de ADN recombinante, el ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencía fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma descritas en el presente documento sirven como una fuente de preferencia de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en las células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otra manera proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Los artículos de recopilación sobre expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo

incluyen Skerra y col. (1993) *Curr. Opin. in Immunol.* 5: 256 y Phickthun (1992) *Immunol. Revs.* 130: 151. Como alternativa, puede producirse anticuerpo en una línea celular tal como una línea celular CHO, como se da a conocer en las Patentes de EEUU N° 5.545.403; 5.545.405; y 5.998.144. En resumen, la línea celular se transfecta con vectores capaces de expresar una cadena ligera y una cadena pesada, respectivamente. Transfectando las dos proteínas en vectores separados, pueden producirse anticuerpos quiméricos. Otra ventaja es la glicosilación correcta del anticuerpo.

En algunas formas de realización, el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo el anticuerpo CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno se produce en células CHO usando el sistema de expresión de genes GS (Lonza Biologics, Portsmouth, New Hampshire), que usa glutamina sintetasa como un marcador. Véase también las Patentes de EEUU N° 5.122.464; 5.591.639; 5.658.759; 5.770.359; 5.827.739; 5.879.936; 5.891.693; y 5.981.216.

Los anticuerpos monoclonales contra CD40 son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, las secciones dedicadas a antígenos de células B en McMichael, ed. (1987; 1989). *Leukocyte Typing III and IV* (Oxford University Press, Nueva York); Patentes de EEUU N° 5.674.492; 5.874.082; 5.677.165; 6.056.959; documento WO 00/63395; documentos de Publicación Internacional N° WO 02/28905 y WO 02/28904; Gordon y col. (1988) *J. Immunol.* 140: 1425; Valle y col. (1989) *Eur. J. Immunol.* 19: 1463; Clark y col. (1986) *PNAS* 83: 4494; Paulie y col. (1989) *J. Immunol.* 142: 590; Gordon y col. (1987) *Eur. J. Immunol.* 17: 1535; Jabara y col. (1990) *J. Exp. Med.* 172: 1861; Zhang y col. (1991) *J. Immunol.* 146: 1836; Gascan y col. (1991) *J. Immunol.* 147: 8; Banchereau y col. (1991) *Clin. Immunol. Spectrum* 3: 8; y Banchereau y col. (1991) *Science* 251: 70. Son de particular interés para la presente invención los anticuerpos anti CD40 antagonistas dados a conocer en el presente documento que comparten las características de unión de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos anteriormente.

La expresión “epítipo del antígeno CD40” según se utiliza en el presente documento se refiere a una molécula que es capaz de tener inmunoreactividad con los anticuerpos monoclonales anti CD40 de la presente invención, excluyendo el propio antígeno CD40. Los epítopos del antígeno CD40 pueden comprender proteínas, fragmentos de proteínas, péptidos, hidratos de carbono, lípidos y otras moléculas, pero para los fines de la presente invención son más comúnmente proteínas, oligopéptidos cortos, miméticos de oligopéptidos (es decir, compuestos orgánicos que imitan las propiedades de unión al anticuerpo del antígeno CD40), o sus combinaciones. Los miméticos de oligopéptidos adecuados se describen, entre otros, en la solicitud de PCT US 91/04282.

Además, la expresión “anticuerpo anti CD40” según se utiliza en el presente documento abarca anticuerpos quiméricos anti CD40; tales anticuerpos anti CD40 quiméricos para uso en los procedimientos de la invención tienen las características de unión de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos en el presente documento. Por anticuerpos “quiméricos” se entiende que de más preferencia se obtienen usando técnicas de ácido desoxirribonucleico recombinante y que comprenden tanto componentes humanos (incluidas especies inmunológicamente “relacionadas”, por ejemplo, chimpancé) como no humanos. Por consiguiente, la región constante del anticuerpo quimérico es de más preferencia sustancialmente idéntica a la región constante de un anticuerpo natural humano; la región variable del anticuerpo quimérico de más preferencia se obtiene de una fuente no humana y tiene la especificidad antigénica deseada para el antígeno CD40 de superficie celular. La fuente no humana puede ser cualquier fuente de vertebrado que pueda usarse para generar anticuerpos contra un antígeno CD40 humano de superficie celular o material que comprenda un antígeno CD40 humano de superficie celular. Tales fuentes no humanas incluyen, pero no se limitan a, roedores (por ejemplo, conejo, rata, ratón, etc.; véase, por ejemplo, la Patente de EEUU N° 4.816.567) y primates no humanos (por ejemplo, mono del viejo mundo, simio, etc.; véase, por ejemplo, las Patentes de EEUU N° 5.750.105 y 5.756.096). Según se usa en el presente documento, la frase “inmunológicamente activo” cuando se usa en referencia a anticuerpos anti CD40 quiméricos significa un anticuerpo quimérico que se une a CD40 humano.

Los anticuerpos anti CD40 quiméricos y humanizados también están abarcados por el término anticuerpo anti CD40 según se utiliza en el presente documento. Los anticuerpos quiméricos comprenden segmentos de anticuerpos obtenidos de diferentes especies. Rituxan® es un ejemplo de un anticuerpo quimérico con una región variable murina y una región constante humana.

Por “humanizado” se entienden formas de anticuerpos anti CD40 que contienen una secuencia mínima derivada de secuencias de inmunoglobulinas no humanas. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que están reemplazados residuos de una región hipervariable (también conocida como región determinante de complementariedad o CDR) del receptor por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. La expresión “región determinante de complementariedad” se refiere a las secuencias de aminoácidos que juntas definen la afinidad y especificidad de unión de la región Fv natural de un sitio de unión de inmunoglobulina nativa. Véase, por ejemplo, Chothia y col. (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917; Kabat y col. (1991) *U.S. Dept of Health and Human Services, Publicación NIH N° 91-3242*. La expresión “región constante” se refiere a la parte de la molécula de anticuerpo que confiere funciones de efector. En trabajos anteriores dirigidos a la producción de anticuerpos no inmunogénicos para uso en terapia de enfermedades humanas, se sustituyeron regiones constantes de ratón por regiones constantes humanas. Las regiones constantes de los anticuerpos humanizados del sujeto se obtuvieron de inmunoglobulinas humanas. Sin embargo, estos anticuerpos humanizados aún provocaron una respuesta inmune no deseada y potencialmente peligrosa en seres humanos y hubo pérdida de afinidad. Los anticuerpos anti CD40 humanizados para uso en los procedimientos de la presente invención tienen características de unión similares a las exhibidas por los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos en el presente documento.

La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col. (1986) *Nature* 321: 522-525; Riechmann y col. (1988) *Nature* 332: 323-327; Verhoeyen y col. (1988) *Science* 239: 1534-1536), sustituyendo secuencias de un anticuerpo humano por las correspondientes CDR o secuencias CDR de roedores o roedores mutantes. Véase también las Patentes de EEUU N° 5.225.539; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.859.205. En algunos casos, los residuos dentro de las regiones marco de una o más regiones variables de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes residuos no humanos (véase, por ejemplo, las Patentes de EEUU N° 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; y 6.180.370). Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se realizan para refinar más el rendimiento del anticuerpo (por ejemplo, para obtener la afinidad deseada). En general, en anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en el que todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones y col. (1986) *Nature* 331: 522-525; Riechmann y col. (1988) *Nature* 332: 323-329; y Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" pueden incluir anticuerpos en los que sustancialmente menos de un dominio variable intacto humano se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos del marco están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores. Véase, por ejemplo, las Patentes de EEUU N° 5.225.539; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.859.205. Véase también la Patente de EEUU N° 6.180.370, y el documento de Publicación Internacional WO 01/27160, en los que se dan a conocer anticuerpos humanizados y técnicas para producir anticuerpos humanizados que tienen mejor afinidad para un antígeno predeterminado.

También están abarcados por el término anticuerpos anti CD40 los anticuerpos anti CD40 xenogénicos o modificados producidos en un huésped mamífero no humano, más particularmente un ratón transgénico, caracterizados por loci de inmunoglobulina (Ig) endógena inactivados. En tales animales transgénicos, los genes endógenos competentes para la expresión de las subunidades ligera y pesada de las inmunoglobulinas del huésped se convierten en no funcionales y se sustituyen con los loci análogos de inmunoglobulina humana. Estos animales transgénicos producen anticuerpos humanos en ausencia sustancial de subunidades ligera o pesada de inmunoglobulina del huésped. Véase, por ejemplo, la Patente de EEUU N° 5.877.397 y 5.939.598.

De preferencia, los anticuerpos totalmente humanos contra CD40 se obtienen inmunizando ratones transgénicos. Uno de tales ratones se obtiene usando tecnología Xenomouse® (Abgenix; Fremont, California), y se da a conocer en las Patentes de EEUU N° 6.075.181, 6.091.001 y 6.114.598. Para producir los anticuerpos que se dan a conocer en el presente documento, se inmunizaron ratones transgénicos para el locus de cadena pesada de IgG₁ humana y el locus de cadena ligera κ humana con células Sf9 que expresan CD40 humano. Los ratones también pueden ser transgénicos para otros isotipos. Los anticuerpos totalmente humanos útiles en los procedimientos de la presente invención se caracterizan por tener propiedades de unión similares a las exhibidas por los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos en el presente documento.

Los fragmentos de los anticuerpos anti CD40 son adecuados para uso en los procedimientos de la invención siempre que retengan la afinidad deseada del anticuerpo de longitud total. Por consiguiente, un fragmento de un anticuerpo anti CD40 retendrá la capacidad para unirse al antígeno CD40 de superficie de las células B. Tales fragmentos se caracterizan por tener propiedades similares al anticuerpo anti CD40 antagonista de longitud total correspondiente, es decir, los fragmentos se unirán específicamente a un antígeno CD40 humano expresado en la superficie de una célula humana, y están exentos de actividad agonista significativa pero exhiben actividad antagonista cuando se unen a un antígeno CD40 en una célula humana que expresa CD40. En el presente documento se hace referencia a estos fragmentos como fragmentos "que se unen al antígeno".

Los fragmentos de un anticuerpo que se unen al antígeno adecuados comprenden una parte de un anticuerpo de longitud total, por lo general la región de unión al antígeno o una de sus regiones variables. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, F(ab')₂ y Fv y moléculas de anticuerpos de cadena simple. Por "Fab" se entiende un fragmento monovalente de una inmunoglobulina que se une al antígeno que está compuesto por la cadena ligera y parte de la cadena pesada. Por F(ab')₂ se entiende un fragmento bivalente de una inmunoglobulina que se une al antígeno que contiene ambas cadenas ligeras y parte de ambas cadenas pesadas. Por "Fv de cadena simple" o fragmentos "sFv" del anticuerpo se entiende fragmentos que comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una cadena polipeptídica simple. Véase, por ejemplo, las Patentes de EEUU N° 4.946.778, 5.260.203, 5.455.030 y 5.856.456. Por lo general, el polipéptido Fv comprende además un conector de polipéptido entre los dominios V_H y V_L que permite al sFv formar la estructura deseada para la unión del antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun (1994) en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, ed. Rosenburg and Moore (Springer-Verlag, Nueva York), páginas 269-315. Los fragmentos de los anticuerpos anti CD40 antagonistas que se unen al antígeno dados a conocer en el presente documento también pueden conjugarse a una citotoxina para producir la lisis de las células cancerosas diana, como se describe a continuación en el presente documento.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos generadas usando las técnicas descritas en, por ejemplo, McCafferty y col. (1990) *Nature* 348: 552-554 (1990) y en la Patente

te de EEUU N° 5.514.548. Clackson y col. (1991) Nature 352: 624-628 y Marks y col. (1991) J. Mol. Biol. 222: 581-597 describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (del orden de nM) por mezcla aleatoria de cadenas (Marks y col. (1992) Biol/Technology 10:779-783), así como por infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse y col. (1993) Nucleic Acids Res. 21: 2265-2266). Por consiguiente, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridomas de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtuvieron por digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto y col. (1992) Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992) y Brennan y col. (1985) Science 229: 81). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente por medio de células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de la biblioteca de anticuerpos de fagos analizada anteriormente. Como alternativa, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y pueden acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter y col. (1992) Bio/Technology 10: 163-167). Según otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otra técnica para la producción de fragmentos de anticuerpos resultará evidente para el experto en la técnica.

Los anticuerpos anti CD40 antagonistas útiles en los procedimientos de la presente invención incluyen los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR 12.12 dados a conocer en el presente documento así como los anticuerpos que difieren de estos anticuerpos pero que retienen las CDR; y los anticuerpos con una o más adiciones, deleciones o sustituciones, en los que la actividad antagonista se mide por inhibición de la proliferación y/o diferenciación de las células B. La invención también abarca los anticuerpos anti CD40 antagonistas desimmunizados, que pueden producirse como se describe en, por ejemplo, los documentos de Publicación Internacional N° WO 98/52976 y WO 0034317. De esta manera, los residuos dentro de los anticuerpos anti CD40 antagonistas de la invención se modifican para convertir a los anticuerpos en no inmunogénicos o menos inmunogénicos para los seres humanos manteniendo al mismo tiempo su actividad antagonista hacia las células humanas que expresan CD40, en los que tal actividad se mide por medio de los ensayos señalados en otra parte en el presente documento. También se incluyen dentro del alcance de las reivindicaciones las proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo anti CD40 antagonista de la invención, o uno de sus fragmentos, cuyas proteínas de fusión pueden sintetizarse o expresarse a partir de vectores de polinucleótidos correspondientes, como se conoce en la técnica. Tales proteínas de fusión se describen con referencia a la conjugación de anticuerpos como se señala a continuación.

Los anticuerpos de la presente invención pueden tener variaciones de secuencia producidas usando los procedimientos descritos en, por ejemplo, los documentos de Publicación de Patente N° EP 0 983 303 A1, WO 00/34317 y WO 98/52976. Por ejemplo, se ha mostrado que las secuencias dentro de la CDR pueden provocar que un anticuerpo se una a MAC Clase II y desencadenar una respuesta de células T ayudantes no deseada. Una sustitución conservadora puede permitir que el anticuerpo retenga la actividad de unión y aún pierda su capacidad para desencadenar una respuesta de células T no deseada. Cualquiera de tales sustituciones conservadoras o no conservadoras puede realizarse usando procedimientos reconocidos en la técnica, tales como los señalados en otra parte en el presente documento, y los anticuerpos resultantes se encontrarán dentro del alcance de la invención. Los anticuerpos variantes pueden probarse de manera rutinaria para verificar su actividad antagonista, afinidad y especificidad usando los procedimientos descritos en el presente documento.

Un anticuerpo producido por cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, o cualquier otro procedimiento no dado a conocer en el presente documento, se encontrará dentro del alcance de esta descripción si posee al menos una de las siguientes actividades biológicas: inhibición de la secreción de inmunoglobulinas por las células B periféricas humanas normales estimuladas por células T; inhibición de la supervivencia y/o proliferación de células B periféricas humanas normales estimuladas por células T Jurkat; inhibición de la supervivencia y/o proliferación de células B periféricas humanas normales estimuladas por células que expresan CD40L o ligando de CD40 soluble (sCD40L); inhibición de señales intracelulares intra apoptóticas de "supervivencia" en cualquier célula estimulada por sCD40L o CD40L de fase sólida; inhibición de transducción de señal de CD40 en cualquier célula tras la unión con sCD40L o CD40L de fase sólida; e inhibición de la proliferación de células B neoplásicas humanas como se señala a continuación. Estos ensayos pueden realizarse como se describe en los Ejemplos en el presente documento. Véase también los ensayos descritos en Schultze y col. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8200-8204; Denton y col. (1998) Pediatr. transplant. 2: 6-15; Evans y col. (2000) J. Immunol. 164: 688-697; Noelle (1998) Agents Actions Suppl. 49: 17-22; Lederman y col. (1996) Curr. Opin. Hematol. 3: 77-86; Coligan y col. (1991) Current Protocols in Immunology 13: 12; Kwekkeboom y col. (1993) Immunology 79: 439-444; y Patentes de EEUU N° 5.674.492 y 5.847.082.

Un ensayo representativo para detectar anticuerpos anti CD40 antagonistas específicos para los epítomos del antígeno CD40 identificado en el presente documento es un "ensayo de unión competitiva". Los ensayos de unión competitiva son ensayos serológicos en los que el desconocido se detecta y cuantifica por su capacidad para inhibir la unión de un ligando conocido marcado a su anticuerpo específico. Esto también se conoce como un ensayo de inhibición competitiva. En un ensayo de unión competitiva representativo, se precipita el polipéptido CD40 marcado por medio de anticuerpos candidato en una muestra, por ejemplo, en combinación con anticuerpos monoclonales surgidos contra uno o más epítomos de los anticuerpos monoclonales de la invención. Los anticuerpos anti CD40 que reaccionan específicamente con un epítomo de interés pueden identificarse seleccionando una serie de anticuerpos preparados contra

ES 2 333 971 T3

una proteína CD40 o fragmento de la proteína que comprende el epítipo particular de la proteína CD40 de interés. Por ejemplo, para CD40 humano, los epítipos de interés incluyen epítipos que comprenden residuos de aminoácido lineales o no lineales de la isoforma corta del CD40 humano (véase GenBank N° de acceso NP 690593) presentada en la Figura 12 (SEC ID N° 10), codificada por la secuencia presentada en la Figura 12A (SEC ID N° 9; véase también GenBank N° de acceso M 152854), o de la isoforma larga de CD40 humano (véase GenBank N° de acceso CAA43045 y NP 001241) presentada en la Figura 12D (SEC ID N° 12), codificada por la secuencia presentada en la Figura 12C (SEC ID N° 11; véase GenBank N° de acceso X60592 y MN 001250). Como alternativa, podrían usarse ensayos de unión competitiva con anticuerpos anti CD40 antagonistas adecuados identificados anteriormente para seleccionar los anticuerpos monoclonales comparables a los anticuerpos identificados anteriormente.

Los anticuerpos utilizados en tales inmunoensayos pueden estar marcados o no marcados. Los anticuerpos no marcados pueden utilizarse en aglutinación; los anticuerpos marcados pueden utilizarse en una amplia diversidad de ensayos, usando una amplia diversidad de marcadores. La detección de la formación de un complejo antígeno-anticuerpo entre un anticuerpo anti CD40 y un epítipo de interés puede facilitarse fijando una sustancia detectable al anticuerpo. Los medios de detección adecuados incluyen el uso de marcadores como radionúclidos, enzimas, coenzimas, fluorescentes, quimioluminiscentes, cromógenos, complejos enzima sustrato o cofactores, inhibidores de enzimas, complejos de grupos prostéticos, radicales libres, partículas, colorantes y similares. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen la peroxidasa del rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes apropiados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material fluorescente es el luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y los ejemplos de material radiactivos adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H . Tales reactivos marcados pueden utilizarse en una diversidad de ensayos conocidos, tales como radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos, por ejemplo, ELISA inmunoensayos fluorescentes y similares. Véase, por ejemplo, Patentes de EEUU N° 3.766.162; 3.791.932; 3.817.837; y 4.233.402.

Cualquiera de los anticuerpos anti CD40 antagonistas o sus fragmentos de anticuerpos descritos previamente pueden conjugarse antes del uso en los procedimientos de la presente invención. Los procedimientos para producir anticuerpos conjugados son conocidos en la técnica. Por consiguiente, el anticuerpo anti CD40 puede marcarse usando una marcación indirecta o un enfoque de marcación indirecta. Por “marcación indirecta” o “enfoque de marcación indirecta” se entiende que un agente quelante se une covalentemente a un anticuerpo y se inserta al menos un radionúclido en el agente quelante. Véase, por ejemplo, los agentes quelantes y radionúclidos descritos en Srivagtava and Mease (1991) Nucl. Med. Bio. 18: 589-603.

Los marcadores adecuados incluyen fluoróforos, cromóforos, átomos radiactivos (especialmente ^{32}P y ^{125}I), reactivos densos a electrones, enzimas y ligandos que tienen parejas de unión específicas. Las enzimas se detectan normalmente por su actividad. Por ejemplo, la peroxidasa del rábano picante se detecta usualmente mediante su capacidad para convertir 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) en un pigmento azul, cuantificable con un espectrofotómetro. “Pareja de unión específica” se refiere a una proteína capaz de unirse a una molécula de ligando con alta especificidad, como por ejemplo en el caso de un antígeno y un anticuerpo monoclonal específico para éste. Otras parejas de unión específica incluyen biotina y avidina o estreptavidina, IgG y proteína A, y las numerosas parejas de receptor-ligando conocidas en la técnica. Debería entenderse que la descripción anterior no pretende categorizar los diversos marcadores en diferentes clases, ya que el mismo marcador puede servir en varios modos diferentes. Por ejemplo, ^{125}I puede servir como un marcador radioactivo o como un reactivo denso en electrones. HRP puede servir como enzima o como antígeno para un mAb. Además, pueden combinarse diversos marcadores para el efecto deseado. Por ejemplo, los mAb y la avidina también requieren marcadores en la práctica de esta invención: por consiguiente, puede marcarse un mAb con biotina, y detectarse su presencia con avidina marcada con ^{125}I , o con un mAb anti-biotina marcado con HRP. Otras permutaciones y posibilidades serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica, y se consideran como equivalentes dentro del alcance de la presente invención.

Como alternativa, el anticuerpo anti CD40 puede marcarse usando “marcación directa” o un “enfoque de marcación directa”, en el que un radionúclido se fija covalentemente a un anticuerpo (típicamente a través de un residuo de aminoácido). Los radionúclidos de preferencia se proporcionan en Srivagtava and Mease (1991) *supra*. El enfoque de marcación indirecta es particularmente de preferencia. Véase también, por ejemplo, los documentos de Publicación Internacional N° WO 00/52031 y WO 00/52473, en los que se usa un conector para fijar el marcador radiactivo a los anticuerpos; y las formas marcadas de anticuerpos anti CD40 descritas en la Patente de EEUU N° 6.015.542.

Además, un anticuerpo (o su fragmento) puede conjugarse a un resto terapéutico como una citotoxina, un agente terapéutico, iones metálicos radiactivos o radioisótopos. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células. Algunos ejemplos incluyen taxol, citochalasin B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y sus análogos y homólogos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antracilinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina

(AMC)) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina) Los radioisótopos incluyen, pero no se limitan a, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, Bi-213, Pd-109, Tc-99, In-111 y similares. Los conjugados de la invención pueden utilizarse para modificar una respuesta biológica determinada; no debe entenderse que el resto del fármaco esté limitado a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto del fármaco puede ser una proteína o un polipéptido que tenga una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina de difteria; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, interferón alfa, interferón beta, factor de crecimiento de los nervios, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, activador tisular del plasminógeno, o, modificadores de respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina 1 ("IL-1"), interleucina 2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulador de colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar tales restos terapéuticos a anticuerpos son bien conocidas. Véase, por ejemplo, Amon y col. (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, ed. Reisfeld y col. (Alan R. Liss, Inc.), páginas 243-256; ed. Hellstrom y col. (1987) "Antibodies for Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery, ed. Robinson y col. (2ª ed; Marcel Dekker, Inc.), páginas 623-653; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, ed. Pinchera y col. páginas 475-506 (Editrice Kurtis, Milán, Italia, 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, ed. Baldwin y col. (Academic Press, Nueva York, 1985), páginas 303-316; y Thorpe y col. (1982) Immunol. Rev. 62: 119-158.

Como alternativa, un anticuerpo puede conjugarse a un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpos como se describe en la Patente de EEUU N° 4.676.980. Además, pueden utilizarse conectores entre los marcadores y los anticuerpos de la invención (véase Patente de EEUU N° 4.831.175). Los anticuerpos o sus fragmentos de unión al antígeno pueden marcarse directamente con yodo, indio, itrio radiactivos o con otras partículas radiactivas conocidas en la técnica (Patente de EEUU N° 5.595.721). El tratamiento puede estar constituido por una combinación de tratamiento con anticuerpos conjugados y no conjugados administrados en forma simultánea o consecutiva (documentos WO 00/52031 y WO 00/52473).

Variantes de anticuerpos anti CD40 antagonistas

En los procedimientos de la presente invención pueden utilizarse variantes de los anticuerpos anti CD40 antagonistas biológicamente activas adecuadas. Tales variantes retendrán las propiedades de unión deseadas del anticuerpo anti CD40 antagonista original. Por lo general, en la técnica están disponibles procedimientos para producir variantes de anticuerpos.

Por ejemplo, pueden prepararse variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 descritos en el presente documento, por medio de mutaciones en la secuencia de ADN clonada que codifica el anticuerpo de interés. Los procedimientos para mutagénesis y alteraciones de secuencias de nucleótidos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Walker and Gastra, eds. (1983) Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, Nueva York); Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-492; Kunkel y col. (1987) Methods Enzymol. 154: 367-382; Sambrook y col. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, Nueva York); Patente de EEUU N° 4.873.192; y las referencias citadas en la misma. En el modelo de Dayhoff y col. (1978) en Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.) puede encontrarse orientación para sustituciones adecuadas de aminoácidos que no afectan la actividad biológica del polipéptido de interés. Las sustituciones conservadoras, tales como los intercambios de un aminoácido con otro que tiene propiedades similares, pueden ser de preferencia. Los ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen, pero no se limitan a, Gly \leftrightarrow Ala, Val \leftrightarrow Ile \leftrightarrow Leu, Asp \leftrightarrow Glu, Lys \leftrightarrow Arg, Asn \leftrightarrow Gln y Phe \leftrightarrow Trp \leftrightarrow Tyr.

En la construcción de variantes del polipéptido de interés del anticuerpo anti CD40 antagonista, las modificaciones se realizan de manera tal que las variantes sigan teniendo la actividad deseada, es decir, afinidad de unión similar y sean capaces de unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expresado en la superficie de una célula humana y estén exentas de actividad agonista significativa pero que exhiban actividad antagonista cuando se unen a un antígeno CD40 en una célula humana que expresa CD40. Obviamente, cualquier mutación realizada en el ADN que codifica la variante polipéptido no deben colocar a la secuencia fuera del marco de lectura y de preferencia no creará regiones complementarias que podrían producir estructura de ARNm secundaria. Véase Publicación de Solicitud de Patente N° 75.444.

Además, la región constante de un anticuerpo anti CD40 antagonista puede mutarse para alterar la función efectora en una serie de formas. Por ejemplo, véase la Patente de EEUU N° 6.737.056B1 y la Publicación de Solicitud de Patente N° 2004/0132101A1, que dan a conocer mutaciones de Fc que optimizan la unión del anticuerpo a los receptores de Fc.

De preferencia, las variantes de un anticuerpo anti CD40 antagonista de referencia tienen secuencias de aminoácidos que tienen al menos 70% o 75% de homología de secuencia, de preferencia al menos 80% u 85% de homología de

ES 2 333 971 T3

secuencia, de más preferencia al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94% ó 95% de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos para la molécula del anticuerpo anti CD40 antagonista de referencia, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 descritos en el presente documento, o con una parte más corta de una molécula de anticuerpo de referencia. De más preferencia, las moléculas comparten al menos 96%, 97%, 98% ó 99% de homología de secuencia. Para los fines de la presente invención, el porcentaje de homología de secuencia se determina usando el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda de huecos afines con parámetros de penalización de hueco abierto de 12 y penalización de extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se enseña en Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489. Una variante puede, por ejemplo, diferir del anticuerpo anti CD40 antagonista de referencia en tan pocos como 1 a 15 residuos de aminoácidos, tan pocos como 1 a 10 residuos de aminoácidos, tal como 6-10, tan pocos como 5, tan pocos como 4, 3, 2, o incluso 1 residuo de aminoácido.

Con respecto a la alineación óptima de dos secuencias de aminoácidos, el segmento contiguo de la secuencia de aminoácidos variante puede tener residuos de aminoácidos adicionales o residuos de aminoácidos delecionados con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia. El segmento contiguo utilizado para la comparación con la secuencia de aminoácidos de referencia incluirá al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos y puede tener 30, 40, 50 o más residuos de aminoácidos. Pueden hacerse correcciones para homología de secuencia asociadas con huecos o sustituciones conservadoras de residuos (véase el algoritmo de búsqueda de Smith-Waterman).

La estructura química exacta de un polipéptido capaz de unirse específicamente a CD40 y que retiene la actividad antagonista, en particular cuando se une al antígeno CD40 en células B malignas, depende de una serie de factores. Como en la molécula están presentes grupos amino y carboxilo ionizables, puede obtenerse un polipéptido particular como una sal ácida o básica, o en forma neutra. Todas las preparaciones que retienen su actividad biológica cuando se colocan en condiciones ambientales adecuadas están incluidas en la definición de anticuerpos anti CD40 antagonistas en el presente documento. Además, puede aumentarse la secuencia de aminoácidos principal del polipéptido por derivatización con restos de azúcar (glicosilación) o por otras moléculas complementarias tales como lípidos, fosfato, grupos acetilo y similares. También puede aumentarse por conjugación con sacáridos. Ciertos aspectos de tal aumento se realizan a través de sistemas de procesamiento postraduccionales del huésped productor; otras de tales modificaciones pueden introducirse *in vitro*. En cualquier caso, tales modificaciones están incluidas en la definición de un anticuerpo anti CD40 usada en el presente documento siempre que no se destruyan las propiedades de antagonista del anticuerpo anti CD40. Se espera que tales modificaciones puedan afectar cuantitativamente o cualitativamente la actividad, ya sea aumentando o disminuyendo la actividad del polipéptido, en los diversos ensayos. Además, pueden modificarse residuos de aminoácidos individuales en la cadena por oxidación, reducción u otra derivatización, y el polipéptido puede escindirse para obtener fragmentos que retengan la actividad. Tales alteraciones que no destruyen la actividad antagonista no retiran a la secuencia del polipéptido de la definición de anticuerpos anti CD40 de interés según se utiliza en el presente documento.

La técnica proporciona orientación sustancial con respecto a la preparación y al uso de las variantes de polipéptidos. En la preparación de las variantes de anticuerpos anti CD40, un experto en la técnica puede determinar fácilmente qué modificaciones a la secuencia de nucleótidos o aminoácidos de la proteína nativa darán como resultado una variante que sea adecuada para uso como un componente terapéuticamente activo de una composición farmacéutica utilizada en los procedimientos dados a conocer en el presente documento.

45 *Procedimientos de terapia usando los anticuerpos anti CD40 antagonistas*

Los procedimientos dados a conocer en el presente documento están dirigidos al uso de anticuerpos anti CD40 antagonistas para tratar pacientes que tienen una enfermedad mediada por la estimulación de señales de CD40 en células que expresan CD40. Por "células que expresan CD40" se entiende las células B normales o malignas que expresan el antígeno CD40. Los procedimientos para detectar la expresión de CD40 en células son muy conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, técnicas de PCR, inmunohistoquímica, citometría de flujo, transferencia Western, ELISA y similares. Por célula B "maligna" se entiende cualquier célula B neoplásica, incluidas, pero no limitadas a, células B derivadas de linfomas incluidos los linfomas de células B de grado bajo, intermedio y alto, linfomas inmunoblásticos, linfomas no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, linfomas inducidos por el virus de Epstein Barr (EBV) y linfomas relacionados con el SIDA, así como leucemias agudas de células B, mielomas, leucemias linfocíticas crónicas, leucemias mieloblásticas agudas, y similares.

En el presente documento se define "tratamiento" como la aplicación o administración de un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno a un paciente, o la aplicación o administración de un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento a un tejido aislado o línea celular de un paciente, en el caso de un paciente que tiene una enfermedad, un síntoma de una enfermedad o una predisposición hacia una enfermedad, siendo el objetivo curar, sanar, calmar, aliviar, alterar, remediar, mejorar o afectar la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición hacia la enfermedad. Por "tratamiento" también se entiende la aplicación o administración de una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o sus fragmentos a un paciente, o la aplicación o administración de una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos anti CD40 o sus fragmentos a un tejido aislado o una línea celular de un paciente, que tiene una enfermedad, un síntoma de una enfermedad o una predisposición hacia una enfermedad, siendo el objetivo curar, sanar, calmar, aliviar, alterar, remediar, mejorar o afectar la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición hacia la enfermedad.

Se entiende por “actividad antitumoral” una reducción en la tasa de proliferación o acumulación de células malignas que expresan CD40, y por consiguiente un descenso en la tasa de crecimiento de un tumor existente o en un tumor que surge durante la terapia, y/o la destrucción de células neoplásicas (tumor) existentes o células neoplásicas formadas nuevas, y por consiguiente un descenso en el tamaño global de un tumor durante la terapia. La terapia con al menos un anticuerpo anti CD40 (o su fragmento de unión al antígeno) provoca una respuesta fisiológica que es ventajosa con respecto al tratamiento de estados de enfermedad asociados con la estimulación de las señales de CD40 en células que expresan CD40 en un ser humano.

Los procedimientos dados a conocer en el presente documento encuentran utilidad en el tratamiento de linfomas no Hodgkin relacionados con la proliferación o acumulación anormal, incontrolable de células B. Para los fines de la presente descripción, se hará referencia a tales linfomas según el esquema de clasificación de *Working Formulation*, es decir los linfomas de células B categorizados como grado bajo, grado intermedio y grado alto (véase “The Non-Hodgkin’s Lymphoma Pathologic Classification Project”, *Cancer* 49 (1982): 2112-2135). Por consiguiente, los linfomas de células B de grado bajo incluyen los linfomas linfocíticos de células pequeñas, linfomas foliculares de células pequeñas hendidas y linfomas foliculares mixtos de células pequeñas hendidas y grandes; los linfomas de grado intermedio incluyen los linfomas foliculares de células grandes, linfomas difusos de células pequeñas hendidas, linfomas difusos mixtos de células pequeñas y grandes y linfomas difusos de células grandes; y los linfomas de grado alto incluyen los linfomas inmunoblásticos de células grandes, linfomas linfoblásticos y linfomas de células pequeñas no hendidas del tipo Burkitt y no Burkitt.

Se sabe que los procedimientos dados a conocer en el presente documento son útiles en el tratamiento terapéutico de linfomas de células B que se clasifican según el sistema Revised European and American Lymphoma Classification (REAL). Tales linfomas de células B incluyen, pero no se limitan a, linfomas clasificados como neoplasias de células B precursoras, tales como leucemia/linfoma linfoblástico de células B; neoplasias de células B periféricas, incluidos la leucemia linfocítica crónica de células B/linfoma linfocítico de células pequeñas, linfoma linfoplasmacitoide/inmunocitoma, linfoma de células del manto (MCL), linfoma centrofolicular (folicular) (incluidos los linfomas difusos de células pequeñas, difuso mixto de células grandes y pequeñas y difuso de células grandes), el linfoma marginal de células B (incluidos los tipos extranodal, nodal y esplénico), la leucemia de células vellosas, el plasmacitoma/mieloma, el linfoma difuso de células B grandes del subtipo mediastínico primario (tímico), el linfoma de Burkitt y el linfoma de Burkitt de grado alto de células B; leucemias agudas; leucemia linfocítica aguda; leucemias mieloblásticas; leucemias mielocíticas agudas; leucemia promielocítica; leucemia mielomonocítica; leucemia monocítica; eritroleucemia; leucemiagranulocítica (leucemia mielocítica crónica); leucemia linfocítica crónica; policitemia vera; mieloma múltiple; macroglobulinemia de Waldenstrom; enfermedad de las cadenas pesadas; y linfomas de células B de grado bajo o grado alto no clasificables.

Se reconoce que los procedimientos dados a conocer en el presente documento pueden ser útiles para prevenir otras consecuencias del tumor surgidas durante la terapia. Los procedimientos dados a conocer en el presente documento son particularmente útiles en el tratamiento de sujetos que tienen linfomas de células B de grado bajo, en particular los sujetos que tienen recaídas tras someterse a quimioterapia convencional. Los linfomas de células B de grado bajo tienen un desarrollo más lento que los linfomas de células B de grado intermedio y alto y se caracterizan por un curso de recaída/remisión. Por consiguiente, el tratamiento de estos linfomas mejora usando los procedimientos dados a conocer en el presente documento, ya que los episodios de recaída se reducen en cantidad y gravedad.

Los anticuerpos anti CD40 antagonistas descritos en el presente documento también pueden encontrar utilidad en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y deficiencias o trastornos del sistema inmunitario, incluyendo, pero no limitadas a, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, esclerodermia, síndrome CREST, miositis inflamatoria, síndrome de Sjogren, enfermedad mixta del tejido conectivo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome de insuficiencia respiratoria aguda, inflamación pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, osteoporosis, hipersensibilidad de tipo retardada, asma, cirrosis biliar primaria y púrpura trombocitopénica idiopática.

De conformidad con los procedimientos dados a conocer en el presente documento, al menos un anticuerpo anti CD40 antagonista (o su fragmento de unión al antígeno) tal como se define en otras partes en el presente documento se utiliza para promover una respuesta terapéutica positiva con respecto a la célula B humana maligna. Por “respuesta terapéutica positiva” con respecto al tratamiento del cáncer se entiende una mejora en la enfermedad asociada con la actividad antitumoral de estos anticuerpos o sus fragmentos, y/o una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad. Es decir, puede observarse un efecto antiproliferativo, prevención de otras consecuencias del tumor, una reducción del tamaño del tumor, una reducción en la cantidad de células cancerosas y/o una disminución en uno o más síntomas mediados por la estimulación de las células que expresan CD40. Por consiguiente, por ejemplo, una mejora de la enfermedad puede ser caracterizada como una respuesta completa. Por “respuesta completa” se entiende la ausencia de enfermedad clínicamente detectable con normalización de cualquier estudio radiográfico, de médula ósea y de líquido cefalorraquídeo (LCR), previamente anormal. Tal respuesta debe persistir durante al menos un mes después del tratamiento según los procedimientos dados a conocer en el presente documento. Como alternativa, una mejora en la enfermedad puede clasificarse como una respuesta parcial. Por “respuesta parcial” se entiende una disminución de al menos el 50% en todas las cargas tumorales que pueden medirse (es decir, la cantidad de células tumorales presentes en el sujeto) en ausencia de nuevas lesiones y que persiste durante al menos un mes. Tal respuesta es aplicable sólo a los tumores que pueden medirse.

ES 2 333 971 T3

La respuesta del tumor puede evaluarse para cambios en la morfología del tumor (es decir, carga general del tumor, tamaño del tumor y similares) utilizando técnicas de detección tales como la exploración de imágenes de resonancia magnética (RM), imágenes de rayos x, exploración por tomografía computerizada (TC), imágenes bioluminiscentes, por ejemplo, imágenes con luciferasa, imágenes de gammagrafía ósea y recogida de muestras de biopsias de tumor
5 incluyendo la aspiración de médula ósea (AMO). Además de estas respuestas terapéuticas positivas, el sujeto que se somete a terapia con el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno puede experimentar el efecto ventajoso de una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad. Por consiguiente, para los tumores de células B, el sujeto puede experimentar una disminución en los llamados síntomas B, es decir, los sudores nocturnos, la fiebre, la pérdida de peso y/o urticaria.

10 Por “dosis o cantidad terapéuticamente eficaz” o “cantidad eficaz” se entiende una cantidad de anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al anticuerpo que, cuando se administra da lugar a una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento de un paciente con una enfermedad que comprende la estimulación de las células que expresan CD40. En algunas formas de realización, una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti CD40 o su fragmento está en el intervalo desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 40 mg/kg, desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 25 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg, desde aproximadamente 5 mg/kg hasta
20 aproximadamente 15 mg/kg, o desde aproximadamente 7 mg/kg hasta aproximadamente 12 mg/kg. Se reconoce que el procedimiento de tratamiento puede comprender una única administración de una dosis terapéuticamente eficaz o múltiples administraciones de una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno.

25 Otra forma de realización de la descripción es el uso de anticuerpos anti CD40 antagonistas para el control de diagnóstico de los niveles proteicos en el tejido como parte de un procedimiento de pruebas clínicas, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse por el acoplamiento del anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos.
30 Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen la peroxidasa del rábano picante, la fosfatasa alcalina, la β -galactosidasa o la acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostético adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material fluorescente incluye el luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen la luciferasa, luciferina y aequorina; y los ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

Los anticuerpos anti CD40 descritos en el presente documento pueden usarse también para proporcionar reactivos, por ejemplo, anticuerpos marcados que pueden usarse, por ejemplo, para identificar células que expresan CD40. Esto puede ser muy útil para determinar el tipo celular de una muestra desconocida. Los paneles de anticuerpos monoclonales pueden usarse para identificar tejidos por especies y/o tipo de órgano. De manera similar, estos anticuerpos anti CD40 pueden usarse para seleccionar células de cultivos tisulares para contaminación (es decir, para seleccionar la presencia de una mezcla de células que expresan CD40 y que no expresan CD40 en un cultivo).

Los anticuerpos anti CD40 antagonistas pueden usarse en combinación con quimioterapéuticos y citocinas conocidos para el tratamiento de estados de enfermedad que comprenden células que expresan CD40 estimuladas. Por ejemplo, los anticuerpos anti CD40 de la invención pueden usarse en combinación con citocinas tales como interleucina 2. En otra forma de realización, los anticuerpos anti CD40 de la invención pueden usarse en combinación con rituximab (IDEC-C2B8; Rituxan[®]; IDEC Pharmaceuticals Corp., San Diego, California).

50 De esta manera, los anticuerpos anti CD40 antagonistas descritos en el presente documento, o sus fragmentos de unión al antígeno, se administran en combinación con al menos otra terapia contra el cáncer, incluidas, pero no limitadas a, cirugía o procedimientos quirúrgicos (por ejemplo, esplenectomía, hepatectomía, linfadenectomía, leucoforesis, trasplante de médula ósea, y similares); terapia de radiación; quimioterapia, opcionalmente en combinación con trasplante autólogo de médula ósea, en las que los agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, fludarabina o fosfato de fludarabina, clorambucilo, vincristina, pentostatina, 2-clorodesoxiadenosina (cladribina), ciclofosfamida, doxorubicina, prednisona, y sus combinaciones, por ejemplo, regímenes que contienen antraciclina tales como CAP (ciclofosfamida, doxorubicina más prednisona), CHOP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona más doxorubicina), VAD (vincristina, doxorubicina, más dexametasona), MP (melfalán más prednisona), y otros agentes citotóxicos y/o terapéuticos usados en quimioterapia tales como mitoxantrona, daunorubicina, idarubicina, asparaginasa, y antimetabolitos, incluidos, pero no limitados a, citarabina, metotrexato, 5-fluorouracilo decarbazina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina y nelarabina; otra terapia anticancerosa con anticuerpos monoclonales (por ejemplo, alemtuzumab (Campath[®]) u otro anticuerpo anti CD52 dirigido a la glicoproteína de superficie celular CD52 en células B malignas; rituximab (Rituxan[®]), el anticuerpo HuMax-CD20 totalmente humano, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar[®]), ibritumomab tiuxetan (Zevalin[®]), o cualquier otro anticuerpo anti
65 CD20 terapéutico dirigido al antígeno CD20 en células B malignas; anticuerpo anti CD19 (por ejemplo, MT103, un anticuerpo biespecífico); anticuerpo anti CD22 (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal humanizado epratuzumab); bevacizumab (Avastin[®]) u otro anticuerpo anticanceroso dirigido al factor de crecimiento vascular endotelial humano; anticuerpo anti CD22 dirigido al antígeno CD22 en células B malignas (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal BL-

22, una toxina alfaCD22); anticuerpo α -M-CSF dirigido al factor estimulante de colonias de macrófagos; anticuerpos dirigidos al activador del receptor del factor kappaB nuclear (RANK) y su ligando (RANKL), que se sobreexpresan en el mieloma múltiple; anticuerpo anti CD23 dirigido al antígeno CD23 en células B malignas (por ejemplo, IDEC-152); anticuerpo anti CD80 dirigido al antígeno CD80 (por ejemplo, IDEC-114); anticuerpo anti CD38 dirigido al antígeno CD38 en células B malignas; anticuerpos dirigidos a los receptores del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (anticuerpos anti MHC) expresados en células B malignas; otros anticuerpos anti CD40 (por ejemplo, SGN-40) dirigidos al antígeno CD40 en células B malignas; y anticuerpos dirigidos al receptor 1 del ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL-R1) (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal agonista humano HGS-ETR1) y TRAIL-R2 expresado en una cantidad de tumores sólidos y tumores de origen hematopoyético); terapia del cáncer basada en moléculas pequeñas, incluidos, pero no limitados a, inhibidores de microtúbulos y/o topoisomerasa (por ejemplo, el inhibidor mitótico dolastatina y análogos de dolastatina; el agente de unión a tubulina T900607; XL119; y el inhibidor de la topoisomerasa aminocamptotecina), SDX-105 (clorhidrato de bendamustina), ixabepilona (un análogo de epitolona, también llamado BMS-247550), inhibidores de proteincinasa C, por ejemplo, midostaurina ((PKC-412, CGP 41251, N-benzoilstaurosporina), pixantrona, eloxatina (un agente antineoplásico), ganite (nitrato de galio), Thalomid® (talidomida), derivados inmunomoduladores de la talidomida (por ejemplo, revlimid (anteriormente revimid)), Affinitak™ (inhibidor antisentido de proteincinasa C-alfa), SDX-101 (R-etodolac, que induce la apoptosis de linfocitos malignos), análogos de nucleósidos purina de segunda generación tales como clofarabina, inhibidores de la producción de la proteína Bcl-2 por células cancerosas (por ejemplo, los agentes antisentido oblimersen y Genasense®), inhibidores de proteasoma (por ejemplo, Velcade™ (bortezomib)), inhibidores de cinasas de molécula pequeña (por ejemplo, CHIR-258), inhibidores de VEGF de molécula pequeña (por ejemplo, ZD-6474), inhibidores de la proteína del choque térmico (HSP) 90 de molécula pequeña (por ejemplo, 17-AAG), agentes inhibidores de desacetilasas de histonas de molécula pequeña (por ejemplo, HPC híbrido/polar de citodiferenciación) tales como ácido suberanolhidroxámico (SAHA), y FR-901228 y agentes apoptóticos tales como Trisenox® (trióxido de arsénico) y Xcytrin® (motexafina gadolinio); terapias contra el cáncer basadas en vacunas/inmunoterapia, incluidas, pero no limitadas a, enfoques de vacunas (por ejemplo, Id-KLH, oncofago, vialentina), inmunoterapia personalizada o inmunoterapia activa de idiotipo (por ejemplo, MyVax® Personalized Immunotherapy, denominada formalmente GTOP-99), Promune® (CpG 7909, un agonista sintético para el receptor de tipo toll 9 (TLR9)), terapia con interferón alfa, terapia con interleucina 2 (IL-2), terapia con IL-12, terapia con IL-15 y terapia con IL-21; terapia con esteroides; u otra terapia contra el cáncer; en las que la terapia anticancerosa adicional se administra antes de, durante, o posteriormente a la terapia con el anticuerpo anti CD40 antagonista. Por consiguiente, cuando las terapias combinadas comprenden la administración de un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno en combinación con la administración de otro agente terapéutico, como con quimioterapia, terapia de radiación, otra terapia anticancerosa con anticuerpos, terapia contra el cáncer basada en moléculas pequeñas, o terapia contra el cáncer basada en vacunas/inmunoterapia, los procedimientos dados a conocer en el presente documento abarcan la coadministración, usando formulaciones separadas de una formulación farmacéutica única, y/o la administración consecutiva en cualquier orden. Cuando los procedimientos dados a conocer en el presente documento comprenden regímenes terapéuticos combinados, estas terapias pueden darse de manera simultánea, es decir, el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno se administra simultáneamente o dentro del mismo período de tiempo que la otra terapia contra el cáncer (es decir, las terapias tienen lugar simultáneamente, pero el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno no se administra precisamente en el mismo momento que la otra terapia contra el cáncer). Como alternativa, el anticuerpo anti CD40 antagonista de la presente invención o su fragmento de unión al antígeno puede también administrarse antes de, o posteriormente a la otra terapia contra el cáncer. La administración secuencial de las diferentes terapias contra el cáncer puede realizarse independientemente de que el sujeto tratado responda al primer curso de terapia para disminuir la posibilidad de remisión o recaída. Cuando las terapias combinadas comprenden la administración de un agente citotóxico, de preferencia el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno se administra antes de administrar el agente citotóxico.

En algunas formas de realización de la invención, los anticuerpos anti CD40 antagonistas descritos en el presente documento, o sus fragmentos de unión al antígeno, se administran en combinación con quimioterapia, y opcionalmente en combinación con trasplante autólogo de médula ósea, en las que el anticuerpo y el(los) agente(s) quimioterapéuticos pueden administrarse de manera secuencial, en cualquier orden, o simultáneamente (es decir, de manera simultánea o dentro del mismo período de tiempo). Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, fludarabina o fosfato de fludarabina, clorambucilo, vincristina, pentostatina, 2-clorodesoxiadenosina (cladribina), ciclofosfamida, doxorubicina, prednisona, y sus combinaciones, por ejemplo, regímenes que contienen antraciclina tales como CAP (ciclofosfamida, doxorubicina más prednisona), CHOP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona más doxorubicina), VAD (vincristina, doxorubicina, más dexametasona), MP (melfalán más prednisona), y otros agentes citotóxicos y/o terapéuticos usados en quimioterapia tales como mitoxantrona, daunorubicina, idarubicina, asparaginasa, y antimetabolitos, incluidos, pero no limitados a, citarabina, metotrexato, 5-fluorouracilo decarbazina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina y nelarabina. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno se administra antes del tratamiento con el agente quimioterapéutico. En formas de realización alternativas, el anticuerpo anti CD40 antagonista se administra después del tratamiento con el agente quimioterapéutico. En aún otras formas de realización, el agente quimioterapéutico se administra de manera simultánea con el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno.

Por consiguiente, por ejemplo, en algunas formas de realización, el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno se administra en combinación con fludarabina o fosfato de fludarabina. En una de tales formas de realización, el anticuerpo anti CD40 antagonista

o su fragmento de unión al antígeno se administra antes de la administración de fludarabina o fosfato de fludarabina. En formas de realización alternativas, el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno se administra después del tratamiento con fludarabina o fosfato de fludarabina. En aún otras formas de realización, la fludarabina o el fosfato de fludarabina se administra de manera simultánea con el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno.

En otras formas de realización de la invención, se administra clorambucilo, un agente alquilante, en combinación con el anticuerpo anti CD40 antagonista descrito en el presente documento, por ejemplo el anticuerpo monoclonal CHIR 12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno. En una de tales formas de realización, el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno se administra antes de la administración del clorambucilo. En formas de realización alternativas, el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno se administra después del tratamiento con clorambucilo. En aún otras formas de realización, el clorambucilo se administra de manera simultánea con el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno.

En aún otras formas de realización, pueden combinarse regímenes que contienen antraciclina tales como CAP (ciclofosfamida, doxorubicina más prednisona) y CHOP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona más doxorubicina) con la administración de un anticuerpo anti CD40 antagonista descrito en el presente documento, por ejemplo el anticuerpo monoclonal CHIR 12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno. En una de tales formas de realización, el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno se administra antes de la administración de los regímenes que contienen antraciclina. En otras formas de realización, el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno se administra después del tratamiento con regímenes que contienen antraciclina. En aún otras formas de realización, el régimen que contiene antraciclina se administra de manera simultánea con el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno.

En formas de realización alternativas, un anticuerpo anti CD40 antagonista descrito en el presente documento, por ejemplo el anticuerpo monoclonal CHIR 12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, se administra en combinación con alemtuzumab (Campath®; distribuido por Berlex Laboratories, Richmond, California). Alemtuzumab es un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado (Campath-1H) que está dirigido al antígeno CD52 expresado en células B malignas. En una de tales formas de realización, el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno se administra antes de la administración de alemtuzumab. En otras formas de realización, el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno se administra después del tratamiento con alemtuzumab. En aún otras formas de realización, el alemtuzumab se administra de manera simultánea con el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno.

En formas de realización alternativas, un anticuerpo anti CD40 antagonista descrito en el presente documento, por ejemplo el anticuerpo monoclonal CHIR 12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, se administra en combinación con un anticuerpo anti CD20 terapéutico dirigido al antígeno CD20 en células B malignas, por ejemplo, rituximab (Rituxan®), el anticuerpo totalmente humano HuMax-CD20, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar®), o ibritumomab tiuxetan (Zevalin®). En una de tales formas de realización, el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno se administra antes de la administración del anticuerpo anti CD20. En otras formas de realización, el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno se administra después del tratamiento con el anticuerpo anti CD20. En aún otras formas de realización, el anticuerpo anti CD20 se administra de manera simultánea con el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno.

En formas de realización alternativas, un anticuerpo anti CD40 antagonista descrito en el presente documento, por ejemplo el anticuerpo monoclonal CHIR 12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, se administra en combinación con una terapia contra el cáncer basada en moléculas pequeñas, incluidas, pero no limitadas a, inhibidores de microtúbulos y/i topoisomerasa (por ejemplo, el inhibidor mitótico dolastatina y análogos de dolastatina; el agente de unión a tubulina T900607; XL119; y el inhibidor de la topoisomerasa aminocamptotecina), SDX-105 (clorhidrato de bendamustina), ixabepilona (un análogo de epotilona, también llamado BMS-247550), inhibidores de proteincinasa C, por ejemplo, midostaurina ((PKC-412, CGP 41251, N-benzoilstaurosporina), pixantrona, eloxatina (un agente antineoplásico), ganite (nitrate de galio), Thalomid® (talidomida), derivados inmunomoduladores de la talidomida (por ejemplo, revlimid (anteriormente revimid)), Affinitak™ (inhibidor antisentido de proteincinasa C-alfa), SDX-101 (R-etodolac, que induce la apoptosis de linfocitos malignos), análogos de nucleósidos purina de segunda generación tales como clofarabina, inhibidores de la producción de la proteína Bcl-2 por células cancerosas (por ejemplo, los agentes antisentido oblimersen y Genasense®), inhibidores de proteasoma (por ejemplo, Velcade™ (bortezomib)), inhibidores de cinasas de molécula pequeña (por ejemplo, CHIR-258), inhibidores de VEGF de molécula pequeña (por ejemplo, ZD-6474), inhibidores de la proteína del choque térmico (HSP) 90 de molécula pequeña (por ejemplo, 17-AAG), agentes inhibidores de desacetilasas de histonas de molécula pequeña (por ejemplo, HPC híbrido/polar de citodiferenciación) tales como ácido suberanihidroxámico (SAHA), y FR-901228 y agentes apoptóticos tales como Trisenox® (tríoóxido de arsénico) y Xcytrin® (motexafina gadolinio). En una de tales formas de realización, el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno se administra antes de la terapia contra el cáncer basada en moléculas pequeñas. En otras formas de realización, el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno se administra después de la terapia contra el cáncer basada en moléculas pequeñas. En aún otras formas de realización, la terapia contra el cáncer basada en moléculas pequeñas se administra de manera simultánea con el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno.

En aún otras formas de realización, un anticuerpo anti CD40 antagonista descrito en el presente documento, por ejemplo el anticuerpo monoclonal CHIR 12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, puede usarse en combinación con una terapia contra el cáncer basada en vacunas/inmunoterapia, incluidas, pero no limitadas a, enfoques de vacunas (por ejemplo, Id-KLH, oncofago, vitalatina), inmunoterapia personalizada o inmunoterapia activa de 5 idiotipo (por ejemplo, MyVax® Personalized Immunotherapy, denominada formalmente GTOP-99), Promune® (CpG 7909, un agonista sintético para el receptor de tipo toll 9 (TLR9)), terapia con interferón alfa, terapia con interleucina 2 (IL-2), terapia con IL-12, terapia con IL-15 y terapia con IL-21; o terapia con esteroides. En una de tales formas de realización, el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno se administra antes de la administración de la terapia contra el cáncer basada en vacunas/inmunoterapia. En otras formas de realización, el anticuerpo 10 anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno se administra después del tratamiento con la terapia contra el cáncer basada en vacunas/inmunoterapia. En aún otras formas de realización, la terapia contra el cáncer basada en vacunas/inmunoterapia se administra de manera simultánea con el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno.

En una de tales formas de realización, un anticuerpo anti CD40 antagonista descrito en el presente documento, por ejemplo el anticuerpo monoclonal CHIR 12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, puede usarse en combinación con IL-2. IL-2, un agente que se sabe que aumenta la cantidad de células efectoras citolíticas naturales (NK) en los pacientes tratados, puede administrarse antes de, o conjuntamente con, el anticuerpo anti CD40 antagonista de la invención o su fragmento de unión al antígeno. Esta cantidad aumentada de células NK efectoras puede dar lugar a mayor actividad ADCC del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno administrado. En 20 otras formas de realización, IL-21 sirve como el agente inmunoterapéutico para estimular la actividad de las células NK cuando se administra en combinación con el anticuerpo anti CD40 antagonista descrito en el presente documento, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR 12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno.

Además, también puede usarse terapia de combinación con dos o más agentes terapéuticos y un anticuerpo anti CD40 descrito en el presente documento para el tratamiento de estados de enfermedad que comprenden células que expresan CD40 estimuladas, por ejemplo cánceres relacionados con células B, y trastornos autoinmunes y/o inflamatorios. Sin estar limitados, los ejemplos incluyen la terapia de combinación triple, en la que dos agentes quimioterapéuticos se administran en combinación con un anticuerpo anti CD40 antagonista descrito en el presente documento, y 30 en la que un agente terapéutico y otro anticuerpo monoclonal anticanceroso (por ejemplo, alemtuzumab, rituximab, o anticuerpo anti CD23) se administran en combinación con un anticuerpo anti CD40 antagonista descrito en el presente documento. Los ejemplos de tales combinaciones incluyen, pero no se limitan a, combinaciones de fludarabina, ciclofosfamida, y el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo el anticuerpo monoclonal CHIR 12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno; y combinaciones de fludarabina, un anticuerpo anti CD20, por ejemplo, rituximab (Rituxan®; IDEC Pharmaceuticals Corp., San Diego, California), y el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, 35 el anticuerpo monoclonal CHIR 12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno.

40 *Formulaciones farmacéuticas y modos de administración*

Los anticuerpos anti CD40 antagonistas de esta invención se administran en una concentración que es terapéuticamente eficaz para prevenir o tratar enfermedades mediadas por células que expresan CD40 tales como SLE, PBC, ITP, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedad de Crohn, rechazo de injertos, y linfoma de células B. Para lograr este objetivo, los anticuerpos pueden formularse usando una diversidad de excipientes aceptables conocidos en la técnica. 45 Típicamente, los anticuerpos se administran por medio de inyección, ya sea por vía intravenosa o por vía intraperitoneal. Los procedimientos para llevar a cabo esta administración son conocidos por los expertos en la técnica. También es posible obtener composiciones que pueden administrarse por vía tópica o por vía oral, o que pueden ser capaces de transmitirse a través de membranas mucosas.

La administración intravenosa se realiza de preferencia por medio de infusión durante un período de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10 horas, de más preferencia durante aproximadamente 1 hasta aproximadamente 8 horas, de más preferencia aún durante aproximadamente 2 hasta aproximadamente 7 horas, todavía de más preferencia durante aproximadamente 4 hasta aproximadamente 6 horas, dependiendo del anticuerpo anti CD40 que se administra. La infusión inicial con la composición farmacéutica puede administrarse durante un período de aproximadamente 55 4 hasta aproximadamente 6 horas con infusiones posteriores administradas de manera más rápida. Las infusiones posteriores pueden administrarse durante un período de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 6 horas, incluyendo, por ejemplo, aproximadamente 1 hasta aproximadamente 4 horas, aproximadamente 1 hasta aproximadamente 3 horas, o aproximadamente 1 hasta aproximadamente 2 horas.

Una composición farmacéutica de la invención está formulada para que sea compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de posibles vías de administración incluyen la administración parenteral (por ejemplo, intravenosa (IV), intramuscular (IM), intradérmica, subcutánea (SC), o la infusión), oral y pulmonar (por ejemplo, inhalación), nasal, transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Las disoluciones o suspensiones usadas para aplicaciones parenterales, intradérmicas o subcutáneas pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, disolución salina, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros 65 disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para ajustar la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH

puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples fabricados de vidrio o de plástico.

Los anticuerpos anti CD40 se proporcionan típicamente por medio de técnicas convencionales en un tampón farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, disolución salina estéril, agua tamponada estéril, propilenglicol, combinaciones de los anteriores, etc. En Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990) se describen procedimientos para preparar agentes que pueden administrarse por vía parenteral. Véase también, por ejemplo, el documento WO 98/56418, que describe formulaciones farmacéuticas de anticuerpos estabilizadas adecuadas para usar en los procedimientos descritos en el presente documento.

Un experto en la técnica puede determinar fácilmente sin excesiva experimentación la cantidad de al menos un anticuerpo anti CD40 o su fragmento a administrar. Los factores que influyen en el modo de administración y la respectiva cantidad de al menos un anticuerpo anti CD40 antagonista (o su fragmento) incluyen, pero se limitan a, la gravedad de la enfermedad, la historia de la enfermedad, y la edad, altura, peso, salud y condición física del individuo que se somete al tratamiento. De manera similar, la cantidad de anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento a administrar dependerá del modo de administración y de si el sujeto se someterá a una monodosis o a dosis múltiples de este agente antitumoral. Por lo general, al aumentar el peso del sujeto sometido al tratamiento, resulta de preferencia una dosis más alta del anticuerpo anti CD40 o su fragmento. La dosis del anticuerpo anti CD40 o su fragmento a administrar está en el intervalo desde aproximadamente 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg, de preferencia en el intervalo de 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 40 mg/kg. Por consiguiente, por ejemplo, la dosis puede ser de 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg o 50 mg/kg.

En otra forma de realización de la divulgación, el procedimiento comprende la administración de dosis múltiples de anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento. El procedimiento puede comprender la administración de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o más dosis terapéuticamente eficaces de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento. La frecuencia y duración de administración de las dosis múltiples de las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpo anti CD40 o su fragmento pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica sin excesiva experimentación. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo puede incluir un tratamiento único o, de preferencia, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo de preferencia, se trata al sujeto con anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 y 20 mg/kg de peso corporal, una vez por semana durante aproximadamente entre 1 y 10 semanas, de preferencia aproximadamente entre 2 y 8 semanas, de más preferencia aproximadamente entre 3 y 7 semanas, y aún de más preferencia durante aproximadamente 4, 5, ó 6 semanas. El tratamiento puede llevarse a cabo anualmente para prevenir la recaída o tras la indicación de la recaída. También se apreciará que la dosis eficaz de anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno usado para el tratamiento puede aumentar o disminuir en el transcurso de un tratamiento particular. Los cambios en la dosis pueden ser el resultado y pueden resultar evidentes a partir de los resultados de los ensayos de diagnóstico como se describe en el presente documento.

Por consiguiente, en una forma de realización, el régimen de dosificación incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti CD40 o su fragmento en los días 1, 7, 14 y 21 de un período de tratamiento. En otra forma de realización, el régimen de dosificación incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti CD40 o su fragmento en los días 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 de una semana en un período de tratamiento. Otras formas de realización incluyen un régimen de dosificación que tiene una primera administración de una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti CD40 o su fragmento en los días 1, 3, 5 y 7 de una semana en un período de tratamiento; un régimen de dosificación incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti CD40 o su fragmento en los días 1 y 3 de una semana en un período de tratamiento; y un régimen de dosificación de preferencia que incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti CD40 o su fragmento en el día 1 de una semana en un período de tratamiento. El período de tratamiento puede comprender 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, un mes, 3 meses, 6 meses o un año. Los períodos de tratamiento pueden ser consecutivos o pueden estar separados uno de otro por un día, una semana, 2 semanas, un mes, 3 meses, 6 meses o un año.

En algunas formas de realización, la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno varía desde aproximadamente 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg, desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 40 mg/kg, desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 0,5 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg, desde aproximadamente 5 mg/kg hasta aproximadamente 15 mg/kg, o desde aproximadamente 7 mg/kg hasta aproximadamente 12 mg/kg. Por consiguiente, por ejemplo, la dosis de cualquier anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno, por ejemplo el anticuerpo monoclonal anti-CD40 CHIR-12.12 o CHIR-5.9 o su fragmento de unión al antígeno, puede ser de 0,003 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, u otra dosis semejante que esté dentro el intervalo desde aproximadamente 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg. La misma dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti CD40 antagonista

o su fragmento de unión al antígeno puede administrarse a lo largo de cada semana de dosificación del anticuerpo. Como alternativa, pueden usarse diferentes dosis terapéuticamente eficaces de un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno durante el transcurso de un período de tratamiento.

5 En otras formas de realización, la dosis terapéuticamente eficaz inicial de un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno según se define en otra parte en el presente documento puede estar en el intervalo de dosificación inferior (es decir, desde aproximadamente 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg) con dosis posteriores dentro del intervalo de dosificación superior (es decir, desde aproximadamente 20 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg).

10 En formas de realización alternativas, la dosis terapéuticamente eficaz inicial de un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno según se define en otra parte en el presente documento puede estar en el intervalo de dosificación superior (es decir, desde aproximadamente 20 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg) con dosis posteriores dentro del intervalo de dosificación inferior (es decir, desde 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg). Por consiguiente, en una forma de realización, la dosis terapéuticamente eficaz inicial del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno es de aproximadamente 20 mg/kg hasta aproximadamente 35 mg/kg, incluyendo aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg y aproximadamente 35 mg/kg, y las posteriores dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno son de aproximadamente 5 mg/kg hasta aproximadamente 15 mg/kg, incluyendo aproximadamente 5 mg/kg, 8 mg/kg, 10 mg/kg, 12 mg/kg y aproximadamente 15 mg/kg.

25 En algunas formas de realización de la invención, el tratamiento con anticuerpo anti CD40 antagonista se inicia administrando una “dosis de carga” del anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno al sujeto que necesita terapia con anticuerpos anti CD40 antagonistas. Por “dosis de carga” se entiende una dosis inicial del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno que se administra al sujeto, en la que la dosis del anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno administrado está dentro del intervalo de dosificación superior (es decir, desde aproximadamente 20 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg). La “dosis de carga” puede administrarse como una única administración, por ejemplo, una infusión única en la que el anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno se administra por vía IV, o como administraciones múltiples, por ejemplo, infusiones múltiples en las que el anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno se administra por vía IV, siempre que la “dosis de carga” completa se administre en un período de aproximadamente 24 horas. Tras la administración de la “dosis de carga”, se administra a continuación una o más dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno al sujeto. Pueden administrarse dosis terapéuticamente eficaces posteriores, por ejemplo, según un programa de dosificación semanal, o una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, o una vez cada cuatro semanas.

35 En tales formas de realización, las dosis terapéuticamente eficaces posteriores generalmente están en el intervalo de dosificación inferior (es decir, desde 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg).

40 Como alternativa, en algunas formas de realización, tras la “dosis de carga”, las posteriores dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno se administran según un “programa de mantenimiento”, en el que la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno se administra una vez al mes, una vez cada 6 semanas, una vez cada dos meses, una vez cada 10 semanas, una vez cada tres meses, una vez cada 14 semanas, una vez cada cuatro meses, una vez cada 18 semanas, una vez cada cinco meses, una vez cada 22 semanas, una vez cada seis meses, una vez cada 7 meses, una vez cada 8 meses, una vez cada 9 meses, una vez cada 10 meses, una vez cada 11 meses, o una vez cada 12 meses. En tales formas de realización, la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno está en el intervalo de dosificación inferior (es decir, desde 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg), en particular cuando las dosis posteriores se administran en intervalos más frecuentes, por ejemplo, una vez cada dos semanas hasta una vez al mes, o dentro del intervalo de dosificación superior (es decir, desde aproximadamente 20 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg), en particular cuando las dosis posteriores se administran en intervalos menos frecuentes, por ejemplo, cuando las dosis posteriores se administran separadas por aproximadamente un mes hasta aproximadamente 12 meses.

55 Los anticuerpos anti CD40 antagonistas presentes en las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento para usar en los procedimientos dados a conocer en el presente documento pueden ser nativos o pueden obtenerse por medio de técnicas recombinantes y pueden ser de cualquier fuente, incluidas las fuentes de mamíferos tales como, por ejemplo, ratón, rata, conejo, primate, cerdo y ser humano. De preferencia tales polipéptidos se obtienen de una fuente humana, y de más preferencia son proteínas humanas, recombinantes de líneas celulares de hibridoma.

60 Las composiciones farmacéuticas útiles en los procedimientos dados a conocer en el presente documento comprenden variantes biológicamente activas de los anticuerpos anti CD40 antagonistas de la invención. Tales variantes deben retener la actividad biológica deseada del polipéptido nativo tal que la composición farmacéutica que comprende el polipéptido variante tenga el mismo efecto terapéutico que la composición farmacéutica que comprende el polipéptido nativo cuando se administra a un sujeto. Es decir, el anticuerpo anti CD40 variante servirá como componente terapéuticamente activo en la composición farmacéutica de manera similar a la observada para el anticuerpo antagonista nativo, por ejemplo CHIR-5.9 o CHIR-12.12 como se expresa por la línea celular de hibridoma 5.9 ó 12.12, respectivamente.

65 En la técnica están disponibles procedimientos para determinar si un anticuerpo anti CD40 variante retiene la actividad biológica deseada, y sirve por consiguiente como un componente terapéuticamente activo en la composición farmacéutica. La actividad biológica de las variantes del anticuerpo puede medirse usando ensayos específicamente diseñados para medir la actividad del anticuerpo antagonista nativo, incluidos los ensayos descritos en el presente documento.

ES 2 333 971 T3

Cualquier composición farmacéutica que comprenda un anticuerpo anti CD40 antagonista que tenga las propiedades de unión descritas en el presente documento como el componente terapéuticamente activo puede usarse en los procedimientos dados a conocer en el presente documento. Por consiguiente, las composiciones líquidas, liofilizadas o secadas por pulverización que comprenden uno o más de los anticuerpos anti CD40 antagonistas de la invención pueden prepararse como una disolución o suspensión acuosa o no acuosa para la posterior administración a un sujeto de acuerdo con los procedimientos dados a conocer en el presente documento. Cada una de estas composiciones comprenderá al menos uno de los anticuerpos anti CD40 antagonistas de la presente invención como un componente terapéuticamente o profilácticamente activo. Por "componente terapéuticamente o profilácticamente activo" se entiende que el anticuerpo anti CD40 está específicamente incorporado en la composición para provocar una respuesta terapéutica o profiláctica con respecto al tratamiento, la prevención o el diagnóstico de una enfermedad o afección en un sujeto cuando se administra la composición farmacéutica a ese sujeto. De preferencia la composición farmacéutica comprende agentes estabilizantes, agentes de carga adecuados, o ambos para reducir al mínimo los problemas asociados con la pérdida de estabilidad y actividad biológica de las proteínas durante la preparación y el almacenamiento.

Pueden añadirse compuestos de formulación a las composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti CD40 antagonista de la invención. Estos compuestos de formulación pueden incluir, pero se limitan a, aceites, polímeros, vitaminas, hidratos de carbono, aminoácidos, sales, tampones, albúmina, tensioactivos o agentes de carga. Los hidratos de carbono de preferencia incluyen azúcares o alcoholes de azúcar tales como mono-, di- o polisacáridos, o glucanos solubles en agua. Los sacáridos o glucanos pueden incluir fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, sucrosa, dextrano, pullulano, dextrina, ciclodextrina α y β , almidón soluble, hidroxietil almidón y carboximetilcelulosa, o sus mezclas. Se define "alcohol de azúcar" como un hidrocarburo C_4 a C_8 que tiene un grupo hidroxilo e incluye galactitol, inositol, manitol, xilitol, sorbitol, glicerol y arabitol. Estos azúcares o alcoholes de azúcar pueden usarse de manera individual o en combinación. La concentración del azúcar o de alcohol de azúcar está entre 1,0% y 7% p/v., de más preferencia entre 2,0% y 6,0% p/v. Los aminoácidos de preferencia incluyen formas levóginas (L) de carnitina, arginina, y betaína; sin embargo, pueden añadirse otros aminoácidos. De preferencia los polímeros incluyen polivinilpirrolidona (PVP) con un peso molecular promedio entre 2.000 y 3.000, o polietilenglicol (PEG) con un peso molecular promedio entre 3.000 y 5.000. Los tensioactivos que pueden añadirse a la formulación se muestran en los documentos EP N° 270.799 y 268.110.

Además, los anticuerpos pueden modificarse químicamente por conjugación covalente a un polímero para, por ejemplo, aumentar su semivida de circulación. Los polímeros de preferencia y los procedimientos para ligarlos a péptidos, se muestran en las Patentes de EEUU N° 4.766.106; 4.179.337; 4.495.285; y 4.609.546.

Los polímeros de preferencia son polioles polioxietilados y polietilenglicol (PEG). El PEG es soluble en agua a temperatura ambiente y tiene la fórmula general: $R(O-CH_2-CH_2)_n-O-R$ donde R puede ser hidrógeno, o un grupo protector tal como un grupo alquilo o alcanol. De preferencia, el grupo protector tiene entre 1 y 8 carbonos, de más preferencia es metilo. El símbolo n es un número entero positivo, de preferencia entre 1 y 1.000, de más preferencia entre 2 y 500. El PEG tiene de preferencia un peso molecular promedio entre 1.000 y 40.000, de más preferencia entre 2.000 y 20.000, de mayor preferencia entre 3.000 y 12.000. De preferencia, el PEG tiene al menos un grupo hidroxilo, de más preferencia es un grupo hidroxilo terminal. Este es el grupo hidroxilo que se activa de preferencia para reaccionar con un grupo amino libre en el inhibidor. Sin embargo, se entenderá que el tipo y la cantidad de los grupos reactivos pueden variarse para obtener un PEG/anticuerpo de la presente invención conjugado de manera covalente.

Los polioles polioxietilados solubles en agua también son útiles en la presente invención. Estos incluyen sorbitol polioxietilado, glucosa polioxietilada, glicerol polioxietilado (POG), y otros. Resulta de preferencia el POG. Una razón es porque la estructura central glicerol del glicerol polioxietilado es la misma estructura central que se presenta en la naturaleza en, por ejemplo, animales y seres humanos en los mono-, di-, triglicéridos. Por consiguiente, esta ramificación no será considerada necesariamente como un agente extraño en el cuerpo. El POG tiene un peso molecular de preferencia en el mismo intervalo que PEG. La estructura para el POG se muestra en Knauf y col. (1988) J. Bio. Chem. 263:15064-15070, y puede encontrarse un análisis de conjugados POG/IL-2 en la Patente de EEUU N°. 4.766.106.

Otro sistema de administración de fármacos para aumentar la semivida circulatoria es el liposoma. Los procedimientos para preparar los sistemas de administración de liposomas se analizan en Gabizon y col. (1982) Cancer Research 42:4734; Cafiso (1981) Biochem Biophys Acta 649:129; y Szoka (1980) Ann. Rev. Biophys. Eng. 9:467. En la técnica se conocen otros sistemas de administración de fármacos y están descritos, por ejemplo, en Poznansky y col. (1980) Drug Delivery Systems (R.L. Juliano, ed., Oxford, N.Y.) páginas 253-315; Poznansky (1984) Pharm Revs 36:277.

Los compuestos de formulación a incorporar en una composición farmacéutica deberían proporcionar estabilidad del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno. Es decir, el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno deberá retener su estabilidad física y/o química y deberá tener la actividad biológica deseada, es decir, una o más de las actividades definidas anteriormente en el presente documento, incluidas, pero no limitadas a, inhibición de la secreción de inmunoglobulinas por células B periféricas humanas normales estimuladas por células T; inhibición de la supervivencia y/o proliferación de las células B periféricas humanas normales estimuladas por células T de Jurkat; inhibición de la supervivencia y/o proliferación de las células B periféricas humanas normales estimuladas por células que expresan CD40L o ligando de CD40 soluble (sCD40L); inhibición de señales intracelulares antiapoptóticas de "supervivencia" en cualquier célula estimulada por sCD40L o CD40L de fase

ES 2 333 971 T3

sólida; inhibición de la transducción de señal de CD40 en cualquier célula tras la unión con sCD40L o CD40L de fase sólida; e inhibición de la proliferación de células B humanas malignas como se señaló en otra parte en el presente documento.

5 Los procedimientos para controlar la estabilidad de las proteínas son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Jones (1993) *Adv Drug Delivery Rev.* 10:29-90; Lee, ed. (1991) *Peptide y Protein Drug Delivery* (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Nueva York); y los ensayos de estabilidad que se dan a conocer en el presente documento a continuación. En general, la estabilidad de las proteínas se mide a una temperatura elegida durante un período de tiempo especificado. En formas de realización de preferencia, una formulación farmacéutica de anticuerpo estable
10 proporciona estabilidad del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno cuando se almacena a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) durante al menos 1 mes, al menos 3 meses, o al menos 6 meses, y/o es estable aproximadamente a 2-8°C durante al menos 6 meses, al menos 9 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses.

15 Una proteína tal como un anticuerpo, cuando se formula en una composición farmacéutica, se considera que mantiene su estabilidad física en un momento dado si no muestra signos visuales (es decir, decoloración o pérdida de transparencia) o signos que pueden medirse (por ejemplo, usando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) o dispersión de luz UV) de precipitación, agregación, y/o desnaturalización en esa composición farmacéutica. Con respecto a la estabilidad química, una proteína tal como un anticuerpo, cuando se formula en una composición farmacéutica,
20 se considera que mantiene su estabilidad química en un momento dado si las medidas de estabilidad química son indicativas de que la proteína (es decir, el anticuerpo) mantiene su actividad biológica de interés en esa composición farmacéutica. Los procedimientos para controlar los cambios en la estabilidad química son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, procedimientos para detectar formas químicamente alteradas de la proteína tales como el resultado de la degradación, usando, por ejemplo, SDS-PAGE, SEC, y/o espectrometría de masas por tiempo de vuelo de desorción/ionización de láser asistida por matriz; y degradación asociada con cambios en la carga molecular (por ejemplo, asociada con desamidación), usando, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico. Véase, por
25 ejemplo, los procedimientos que se dan a conocer en el presente documento a continuación.

Se considera que un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno, cuando se formula en
30 una composición farmacéutica, mantiene una actividad biológica deseada en un momento dado si la actividad biológica deseada en ese momento está aproximadamente dentro del 30%, de preferencia aproximadamente dentro del 20% de la actividad biológica deseada exhibida en el momento en que se preparó la composición farmacéutica según se determina en un ensayo adecuado para la actividad biológica deseada. Los ensayos para medir la actividad biológica deseada de los anticuerpos anti CD40 antagonistas dados a conocer en el presente documento, y sus fragmentos que se unen al
35 antígeno, pueden llevarse a cabo como se describe en los Ejemplos en el presente documento. Véase también los ensayos descritos en Schultze y col. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8200-8204; Denton y col. (1998) *Pediatr. Transplant.* 2:6-15; Evans y col. (2000) *J. Immunol.* 164:688-697; Noelle (1998) *Agents Actions Suppl.* 49:17-22; Lederman y col. (1996) *Curr. Opin. Hematol.* 3:77-86; Coligan y col. (1991) *Current Protocols in Immunology* 13:12; Kwekkeboom y col. (1993) *Immunology* 79:439-444; y las Patentes de EEUU N° 5.674.492 y 5.847.082.

40 En algunas formas de realización de la invención, el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno se formula en una formulación farmacéutica líquida. El anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno puede prepararse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluidos los procedimientos dados a conocer anteriormente en el presente
45 documento. En una forma de realización, el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno se produce de manera recombinante en una línea celular CHO.

Tras su preparación y purificación, el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno puede
50 formularse como una formulación farmacéutica líquida de la manera expuesta en el presente documento. Cuando el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno debe almacenarse antes de su formulación, pueden congelarse, por ejemplo, a $\leq -20^{\circ}\text{C}$, y a continuación descongelarse a temperatura ambiente para otra formulación. La formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno. La cantidad de anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno presente
55 en la formulación tiene en consideración la vía de administración y el volumen de dosis deseado.

De esta manera, la composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 50,0 mg/ml, aproximadamente 0,5 mg/ml hasta aproximadamente 40,0 mg/ml, aproximadamente 1,0 mg/ml hasta aproximadamente 30,0 mg/ml, aproximadamente 5,0 mg/ml hasta aproximadamente 25,0 mg/ml, aproximadamente 5,0 mg/ml hasta aproximadamente 20,0 mg/ml, o aproximadamente 15,0 mg/ml hasta aproximadamente 25,0 mg/ml. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 5,0 mg/ml, aproximadamente 5,0 mg/ml hasta aproximadamente 10,0 mg/ml, aproximadamente 10,0 mg/ml hasta aproximadamente 15,0 mg/ml, aproximadamente 15,0 mg/ml hasta aproximadamente 20,0 mg/ml, aproximadamente 20,0 mg/ml hasta aproximadamente 25,0 mg/ml, aproximadamente 25,0 mg/ml hasta aproximadamente 30,0 mg/ml, aproximadamente 30,0 mg/ml hasta aproximadamente 35,0 mg/ml, aproximadamente 35,0 mg/ml hasta aproximadamente 40,0 mg/ml, aproximadamente 40,0 mg/ml hasta aproximadamente 45,0 mg/ml,

o aproximadamente 45,0 mg/ml hasta aproximadamente 50,0 mg/ml. En otras formas de realización, la composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno en una concentración de aproximadamente 15,0 mg/ml, aproximadamente 16,0 mg/ml, aproximadamente 17,0 mg/ml, aproximadamente 18,0 mg/ml, aproximadamente 19,0 mg/ml, aproximadamente 20,0 mg/ml, aproximadamente 21,0 mg/ml, aproximadamente 22,0 mg/ml, aproximadamente 23,0 mg/ml, aproximadamente 24,0 mg/ml, o aproximadamente 25,0 mg/ml. La composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno y un tampón que mantiene el pH de la formulación en el intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, incluyendo aproximadamente pH 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, y otros valores semejantes dentro del intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0. En algunas formas de realización, el tampón mantiene el pH de la formulación en el intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 6,5, aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 6,0, aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 5,5, aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente 7,0, aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente pH 6,5, o aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente pH 6,0.

En la formulación puede usarse cualquier tampón adecuado que mantenga el pH de la formulación líquida del anticuerpo anti CD40 en el intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, siempre que la estabilidad fisicoquímica y la actividad biológica deseada del anticuerpo se mantengan como se señaló anteriormente en el presente documento. Los tampones incluyen pero no se limitan a, ácidos convencionales y sus sales, donde el contraión puede ser, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o magnesio. Los ejemplos de ácidos convencionales y sus sales que pueden usarse para tamponar la formulación farmacéutica líquida incluyen, pero no se limitan a, tampones de ácido succínico o succinato, ácido cítrico o citrato, ácido acético o acetato, ácido tartárico o tartrato, ácido fosfórico o fosfato, ácido glucónico o gluconato, ácido glutámico o glutamato, ácido aspártico o aspartato, ácido maleico o maleato y ácido málico o malato. La concentración del tampón en la formulación puede ser desde aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 50 mM, incluyendo aproximadamente 1 mM, 2 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, u otros valores semejantes dentro del intervalo de aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 50 mM. En algunas formas de realización, la concentración del tampón en la formulación es desde aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 15 mM, incluyendo aproximadamente 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, u otros valores semejantes dentro del intervalo de aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 15 mM.

En algunas formas de realización de la invención, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR 12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno y tampón succinato o tampón citrato a una concentración que mantiene el pH de la formulación en el intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, de preferencia aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 6,5. Por "tampón succinato" o "tampón citrato" se entiende un tampón que comprende una sal de ácido succínico o una sal de ácido cítrico, respectivamente. En una forma de realización de preferencia, el contraión de succinato o citrato es el catión sodio, por consiguiente el tampón es succinato de sodio o citrato de sodio, respectivamente. Sin embargo, se espera que sea eficaz cualquier catión. Otros posibles cationes de succinato o de citrato incluyen, pero no se limitan a, potasio, amonio, calcio y magnesio. Como se señaló anteriormente, la concentración del tampón succinato o citrato en la formulación puede ser desde aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 50 mM, incluyendo aproximadamente 1 mM, 2 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, u otros valores semejantes dentro del intervalo desde aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 50 mM. En algunas formas de realización, la concentración de tampón en la formulación va desde aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 15 mM, incluyendo aproximadamente 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, o aproximadamente 15 mM. En otras formas de realización, la formulación farmacéutica líquida comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 50,0 mg/ml, o aproximadamente 5,0 mg/ml hasta aproximadamente 25,0 mg/ml, y tampón succinato o citrato, por ejemplo, tampón succinato de sodio o citrato de sodio, a una concentración de aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 20 mM, aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 15 mM, de preferencia aproximadamente 10 mM.

Cuando es deseable que la formulación farmacéutica líquida sea prácticamente isotónica, la formulación farmacéutica líquida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, y un tampón para mantener el pH de la formulación dentro del intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0 puede comprender además una cantidad de un agente de isotonicidad suficiente para hacer que la formulación sea prácticamente isotónica. Por "prácticamente isotónica" se entiende que la formulación acuosa tiene una osmolaridad de aproximadamente 240 mmol/kg hasta aproximadamente 360 mmol/kg, de preferencia aproximadamente 240 hasta aproximadamente 340 mmol/kg, de más preferencia aproximadamente 250 hasta aproximadamente 330 mmol/kg, aún de más preferencia aproximadamente 260 hasta aproximadamente 320 mmol/kg, de mayor preferencia aún aproximadamente 270 hasta aproximadamente 310 mmol/kg. Los procedimientos para determinar la isotonicidad de una disolución son conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Setnikar y col. (1959) J. Am. Pharm. Assoc. 48:628.

Los expertos en la técnica están familiarizados con una diversidad de solutos farmacéuticamente aceptable útiles para proporcionar isotonicidad en las composiciones farmacéuticas. El agente de isotonicidad puede ser cualquier

reactivo capaz de ajustar la presión osmótica de la formulación farmacéutica líquida de la presente invención hasta un valor prácticamente igual al de un líquido corporal. Es deseable utilizar un agente de isotonicidad fisiológicamente aceptable. Por consiguiente, la formulación farmacéutica líquida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, y un tampón para mantener el pH de la formulación dentro del intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, puede comprender además componentes que pueden usarse para proporcionar isotonicidad, por ejemplo, cloruro de sodio; aminoácidos tales como alanina, valina y glicina; azúcares y alcoholes de azúcares (polioles), incluidos, pero no limitados a, glucosa, dextrosa, fructosa, sacarosa, maltosa, manitol, trehalosa, glicerol, sorbitol, y xilitol; ácido acético, otros ácidos orgánicos y sus sales, y cantidades relativamente menores de citratos o fosfatos. El experto en la técnica conocerá otros agentes que son adecuados para proporcionar la tonicidad óptima de la formulación líquida.

En algunas formas de realización de preferencia, la formulación farmacéutica líquida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, y un tampón para mantener el pH de la formulación dentro del intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0 comprende además cloruro de sodio como el agente de isotonicidad. La concentración de cloruro de sodio en la formulación dependerá de la contribución de otros componentes a la tonicidad. En algunas formas de realización, la concentración de cloruro de sodio es aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 300 mM, aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 250 mM, aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 200 mM, aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 175 mM, aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 150 mM, aproximadamente 75 mM hasta aproximadamente 175 mM, aproximadamente 75 mM hasta aproximadamente 150 mM, aproximadamente 100 mM hasta aproximadamente 175 mM, aproximadamente 100 mM hasta aproximadamente 200 mM, aproximadamente 100 mM hasta aproximadamente 150 mM, aproximadamente 125 mM hasta aproximadamente 175 mM, aproximadamente 125 mM hasta aproximadamente 150 mM, aproximadamente 130 mM hasta aproximadamente 170 mM, aproximadamente 130 mM hasta aproximadamente 160 mM, aproximadamente 135 mM hasta aproximadamente 155 mM, aproximadamente 140 mM hasta aproximadamente 155 mM, o aproximadamente 145 mM hasta aproximadamente 155 mM. En una de tales formas de realización, la concentración de cloruro de sodio es aproximadamente 150 mM. En otra de tales formas de realización, la concentración de cloruro de sodio es aproximadamente 150 mM, el tampón es tampón succinato de sodio o citrato de sodio en una concentración de aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 15 mM, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, y la formulación tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 6,0, o aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente pH 6,5. En otras formas de realización, la formulación farmacéutica líquida comprenden el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 50,0 mg/ml o aproximadamente 5,0 mg/ml hasta aproximadamente 25,0 mg/ml, aproximadamente cloruro de sodio 150 mM, y aproximadamente succinato de sodio o citrato de sodio 10 mM, a un pH de aproximadamente pH 5,5.

La degradación proteica por congelación descongelación o cizallamiento mecánico durante el procesamiento de una formulación farmacéutica líquida de la presente invención puede inhibirse incorporando tensioactivos en la formulación para disminuir la tensión superficial en la interfase disolución-aire. Por consiguiente, en algunas formas de realización, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR 5,9, o su fragmento de unión al antígeno, un tampón para mantener el pH de la formulación dentro del intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, y comprende además un tensioactivo. En otras formas de realización, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, un tampón para mantener el pH de la formulación dentro del intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, un agente de isotonicidad tal como cloruro de sodio en una concentración de aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 300 mM, y comprende además un tensioactivo.

Los tensioactivos típicos utilizados son tensioactivos noiónicos, incluidos los ésteres de polioxietilensorbitol tales como polisorbato 80 (Tween 80) y polisorbato 20 (Tween 20); ésteres de polioxipropileno-polioxietileno tales como Pluronic F68; alcoholes de polioxietileno tales como Brij 35; simeticona; polietilenglicol tal como PEG400; lisofosfatidilcolina; y polioxietileno-p-t-octilfenol tal como Triton X-100. La estabilización clásica de compuestos farmacéuticos por medio de tensioactivos o emulsivos se describe, por ejemplo, en Levine y col. (1991) *J. Parenteral Sci. Technol.* 45(3): 160-165. Un tensioactivo de preferencia utilizada en la práctica de la presente invención es polisorbato 80. Cuando se incluye un tensioactivo, éste se añade típicamente en una cantidad desde aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 1,0% (p/v), aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 0,5%, aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 0,4%, aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 0,3%, aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 0,2%, aproximadamente 0,005% hasta aproximadamente 0,5%, aproximadamente 0,005% hasta aproximadamente 0,2%, aproximadamente 0,01% hasta aproximadamente 0,5%, aproximadamente 0,01% hasta aproximadamente 0,2%, aproximadamente 0,03% hasta aproximadamente 0,5%, aproximadamente 0,03% hasta aproximadamente 0,3%, aproximadamente 0,05% hasta aproximadamente 0,5%, o aproximadamente 0,05% hasta aproximadamente 0,2%.

Por consiguiente, en algunas formas de realización, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, el tampón es tampón succinato de sodio o citrato de sodio en una concentración de aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 50 mM, aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 25 mM, o aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 15 mM; la formulación tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 6,0, o aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente pH 6,5; y la formulación comprende además un tensioactivo, por ejemplo, polisorbato 80, en una cantidad desde aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 1,0% o aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 0,5%. Tales formulaciones pueden comprender opcionalmente un agente de isotonicidad, tal como cloruro de sodio en una concentración de aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 300 mM, aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 200 mM, o aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 150 mM. En otras formas de realización, la formulación farmacéutica líquida comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 50,0 mg/ml o aproximadamente 5,0 mg/ml hasta aproximadamente 25,0 mg/ml, incluyendo aproximadamente 20,0 mg/ml; cloruro de sodio aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 200 mM, incluyendo cloruro de sodio aproximadamente 150 mM; succinato de sodio o citrato de sodio a una concentración de aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 20 mM; incluyendo succinato de sodio o citrato de sodio aproximadamente 10 mM; cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 200 mM, incluyendo aproximadamente 150 mM; y opcionalmente un tensioactivo, por ejemplo, polisorbato 80, en una cantidad desde aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 1,0%, incluyendo aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 0,5%; donde la formulación farmacéutica líquida tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 6,0, aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 5,5, aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente pH 6,5, o aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente pH 6,0.

La formulación farmacéutica líquida puede estar esencialmente libre de conservantes y otros vehículos, excipientes, o estabilizadores señalados anteriormente en el presente documento. Como alternativa, la formulación puede incluir uno o más conservantes, por ejemplo, agentes antibacterianos, vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables descritos en el presente documento anteriormente con la condición de que no afecten de manera adversa la estabilidad fisicoquímica del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno. Los ejemplos de vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables incluyen, pero no se limitan a, otros agentes tamponadores, codisolventes, tensioactivos, antioxidantes incluidos ácido ascórbico y metionina, agentes quelantes tales como EDTA, complejos de metales (por ejemplo, complejos Zn-proteína), y polímeros biodegradables tales como poliésteres. Puede encontrarse una discusión detallada de formulación y selección de vehículos, excipientes e isomolitos farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990).

Una vez que la formulación farmacéutica líquida u otra composición farmacéutica descrita en el presente documento está preparada, puede liofilizarse para evitar la degradación. Los procedimientos para liofilizar composiciones líquidas son conocidos por los expertos en la técnica. Justo antes de usar, la composición puede reconstituirse con un diluyente estéril (disolución de Ringer, agua destilada o disolución salina, por ejemplo) que puede incluir otros componentes. Tras la reconstitución, la composición se administra de preferencia a los sujetos usando los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

Uso de anticuerpos anti CD40 antagonistas en la fabricación de medicamentos

La presente descripción también proporciona el uso de un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto por un cáncer caracterizado por crecimiento de células B neoplásicas, en el que el medicamento está coordinado con el tratamiento con al menos otra terapia contra el cáncer. Los cánceres caracterizados por el crecimiento de células B neoplásicas incluyen, pero no se limitan a, los cánceres relacionados con las células B analizados anteriormente en el presente documento, por ejemplo, linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, linfoma de células B, linfoma de células B de grado alto, linfoma de células B de grado intermedio, linfoma de células B de grado bajo, leucemia linfoblástica aguda de células B, leucemia mieloblástica, enfermedad de Hodgkin, plasmacitoma, linfoma folicular, linfoma folicular de células pequeñas hendidas, linfoma folicular de células grandes, linfoma folicular mixto de células pequeñas hendidas, linfoma difuso de células pequeñas hendidas, linfoma linfocítico difuso de células pequeñas, leucemia prolinfocítica, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de zona marginal, linfoma tisular linfoide asociado a mucosas, linfoma monocitoide de células B, linfoma esplénico, leucemia de células vellosas, linfoma difuso de células grandes, linfoma mediastínico de células B grandes, granulomatosis linfomatoide, linfomatosis intravascular, linfoma difuso de células mixtas, linfoma difuso de células grandes, linfoma inmunoblástico, linfoma de Burkitt, linfoma relacionado con el SIDA y linfoma de células del manto.

Por "coordinado" se entiende que el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno se usará antes, durante, o después del tratamiento del sujeto con al menos otra terapia contra el cáncer. Los ejemplos de otras terapias contra el cáncer incluyen, pero no se limitan a, cirugía; terapia con radiación; quimioterapia; opcionalmente en combinación con trasplante autólogo de médula ósea, en las que los agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, fludarabina o fosfato de fludarabina, cloram-

bucilo, vincristina, pentostatina, 2-clorodesoxiadenosina (cladribina), ciclofosfamida, doxorubicina, prednisona, y sus combinaciones, por ejemplo, regímenes que contienen antraciclina tales como CAP (ciclofosfamida, doxorubicina más prednisona), CHOP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona más doxorubicina), VAD (vincristina, doxorubicina, más dexametasona), MP (melfalán más prednisona), y otros agentes citotóxicos y/o terapéuticos usados en quimioterapia tales como mitoxantrona, daunorubicina, idarubicina, asparaginasa, y antimetabolitos, incluidos, pero no limitados a, citarabina, metotrexato, 5-fluorouracilo decarbazina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina y nelarabina; otra terapia anticancerosa con anticuerpos monoclonales (por ejemplo, alemtuzumab (Campath®) u otro anticuerpo anti CD52 dirigido a la glicoproteína de superficie celular CD52 en células B malignas; rituximab (Rituxan®), el anticuerpo HuMax-CD20 totalmente humano, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar®), ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), o cualquier otro anticuerpo anti CD20 terapéutico dirigido al antígeno CD20 en células B malignas; anticuerpo anti CD19 (por ejemplo, MT103, un anticuerpo biespecífico); anticuerpo anti CD22 (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal humanizado epratuzumab); bevacizumab (Avastin®) u otro anticuerpo anticanceroso dirigido al factor de crecimiento vascular endotelial humano; anticuerpo anti CD22 dirigido al antígeno CD22 en células B malignas (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal BL-22, una toxina alfaCD22); anticuerpo α -M-CSF dirigido al factor estimulante de colonias de macrófagos; anticuerpos dirigidos al activador del receptor del factor kappaB nuclear (RANK) y su ligando (RANKL), que se sobreexpresan en el mieloma múltiple; anticuerpo anti CD23 dirigido al antígeno CD23 en células B malignas (por ejemplo, IDEC-152); anticuerpo anti CD38 dirigido al antígeno CD38 en células B malignas; anticuerpos dirigidos a los receptores del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (anticuerpos anti MHC) expresados en células B malignas; otros anticuerpos anti CD40 (por ejemplo, SGN-40) dirigidos al antígeno CD40 en células B malignas; y anticuerpos dirigidos al receptor 1 del ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL-R1) (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal agonista humano HGS-ETR1) expresado en una cantidad de tumores sólidos y tumores de origen hematopoyético); terapia del cáncer basada en moléculas pequeñas, incluidos, pero no limitados a, inhibidores de microtúbulos y/o topoisomerasa (por ejemplo, el inhibidor mitótico dolastatina y análogos de dolastatina; el agente de unión a tubulina T900607; XL119; y el inhibidor de la topoisomerasa aminocamptotecina), SDX-105 (clorhidrato de bendamustina), ixabepilona (un análogo de epitolona, también llamado BMS-247550), inhibidores de proteincinasa C, por ejemplo, midostaurina ((PKC-412, CGP 41251, N-benzoilstaurosporina), pixantrona, eloxatina (un agente antineoplásico), ganite (nitrato de galio), Thalomid® (talidomida), derivados inmunomoduladores de la talidomida (por ejemplo, revlimid (anteriormente revimid)), Affinitak™ (inhibidor antisentido de proteincinasa C-alfa), SDX-101 (R-etodolac, que induce la apoptosis de linfocitos malignos), análogos de nucleósidos purina de segunda generación tales como clofarabina, inhibidores de la producción de la proteína Bcl-2 por células cancerosas (por ejemplo, los agentes antisentido oblimersen y Genasense®), inhibidores de proteasoma (por ejemplo, Velcade™ (bortezomib)), inhibidores de cinasas de molécula pequeña (por ejemplo, CHIR-258), inhibidores de VEGF de molécula pequeña (por ejemplo, ZD-6474), inhibidores de la proteína del choque térmico (HSP) 90 de molécula pequeña (por ejemplo, 17-AAG), agentes inhibidores de desacetilasas de histonas de molécula pequeña (por ejemplo, HPC híbrido/polar de citodiferenciación) tales como ácido suberanilohidroxámico (SAHA), y FR-901228 y agentes apoptóticos tales como Trisenox® (trióxido de arsénico) y Xcytrin® (motexafina gadolinio); terapias contra el cáncer basadas en vacunas/inmunoterapia, incluidas, pero no limitadas a, enfoques de vacunas (por ejemplo, Id-KLH, oncofago, vialatina), inmunoterapia personalizada o inmunoterapia activa de idiotipo (por ejemplo, MyVax® Personalized Immunotherapy, denominada formalmente GTOP-99), Promune® (CpG 7909, un agonista sintético para el receptor de tipo toll 9 (TLR9)), terapia con interferón alfa, terapia con interleucina 2 (IL-2), terapia con IL-12, terapia con IL-15 y terapia con IL-21; terapia con esteroides; u otra terapia contra el cáncer; en las que el tratamiento con la terapia adicional contra el cáncer, o terapias adicionales contra el cáncer, se realizan antes, durante, o posteriormente al tratamiento del sujeto con el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno, como se señaló anteriormente en el presente documento.

En algunas formas de realización, la presente descripción proporciona el uso de un anticuerpo anti CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno en la fabricación de un medicamento para tratar un linfoma de células B, por ejemplo el linfoma no Hodgkin, en un sujeto, en el que el medicamento está coordinado con el tratamiento con al menos otra terapia contra el cáncer seleccionada del grupo constituido por quimioterapia, terapia anticancerosa con anticuerpos, terapia contra el cáncer basada en moléculas pequeñas y terapia contra el cáncer basada en vacunas/inmunoterapia, en el que el medicamento se usará antes, durante o después del tratamiento del sujeto con la otra terapia contra el cáncer o, en el caso de terapias de combinación múltiples, antes, durante o después del tratamiento del sujeto con las otras terapias contra el cáncer.

Por consiguiente, por ejemplo, en algunas formas de realización, la descripción proporciona el uso del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o sus fragmentos de unión al antígeno, en la fabricación de un medicamento para tratar un linfoma de células B, por ejemplo el linfoma no Hodgkin, en un sujeto, en el que el medicamento está coordinado con el tratamiento con quimioterapia, en el que el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo constituido por citoxan, doxorubicina, vincristina, prednisona y sus combinaciones, por ejemplo CHOP. En otras formas de realización, la descripción proporciona el uso del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o sus fragmentos de unión al antígeno, en la fabricación de un medicamento para tratar un linfoma de células B, por ejemplo el linfoma no Hodgkin, en un sujeto, en el que el medicamento está coordinado con el tratamiento con al menos otro anticuerpo anticanceroso seleccionado del grupo constituido por alemtuzumab (Campath®) u otro anticuerpo anti CD52 dirigido a la glicoproteína de superficie celular CD52 en células B malignas; rituximab (Rituxan®), el anticuerpo HuMax-CD20 totalmente humano, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar®), ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), o cualquier otro anticuerpo anti CD20 terapéutico dirigido al antígeno CD20 en células B malignas; anticuerpo anti CD19 (por ejemplo, MT103, un anticuerpo biespecífico); anticuerpo anti CD22

(por ejemplo, el anticuerpo monoclonal humanizado epratuzumab); bevacizumab (Avastin®) u otro anticuerpo anticanceroso dirigido al factor de crecimiento vascular endotelial humano; y cualquiera de sus combinaciones; en el que el medicamento se usará antes, durante o después del tratamiento del sujeto con la otra terapia contra el cáncer o, en el caso de terapias de combinación múltiples, antes, durante o después del tratamiento del sujeto con las otras terapias contra el cáncer.

En aún otras formas de realización, la presente descripción proporciona el uso del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, en la fabricación de un medicamento para tratar un linfoma de células B, por ejemplo el linfoma no Hodgkin, en un sujeto, en el que el medicamento está coordinado con el tratamiento con al menos otra terapia contra el cáncer basada en moléculas pequeñas seleccionada del grupo constituido por inhibidores de microtúbulos y/o topoisomerasa (por ejemplo, el inhibidor mitótico dolastatina y análogos de dolastatina; el agente de unión a tubulina T900607; XL119; y el inhibidor de la topoisomerasa aminocamptotecina), SDX-105 (clorhidrato de bendamustina), ixabepilona (un análogo de epotilona, también llamado BMS-247550), inhibidores de proteincinasa C, por ejemplo, midostaurina ((PKC-412, CGP 41251, N-benzoilstaurosporina), pixantrona, eloxatina (un agente antineoplásico), ganite (nitrato de galio), Thalomid® (talidomida), un agente apoptótico tal como Xcytrin® (metoxafin gadolinio), inhibidores de la producción de la proteína Bcl-2 por células cancerosas (por ejemplo, los agentes antisentido oblimersen y Genasense®), nelarabina, y cualquiera de sus combinaciones; en el que el medicamento se usará antes, durante o después del tratamiento del sujeto con la otra terapia contra el cáncer o, en el caso de terapias de combinación múltiples, antes, durante o después del tratamiento del sujeto con las otras terapias contra el cáncer.

En aún otras formas más de realización, la presente descripción proporciona el uso del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, en la fabricación de un medicamento para tratar un linfoma de células B, por ejemplo el linfoma no Hodgkin, en un sujeto, en el que el medicamento está coordinado con el tratamiento con al menos otra terapia contra el cáncer basada en vacunas/inmunoterapia seleccionada del grupo constituido por enfoques de vacunas (por ejemplo, Id-KLH, oncofago, vitletina), inmunoterapia personalizada o inmunoterapia activa de idiotipo (por ejemplo, MyVax® Personalized Immunotherapy, denominada formalmente GTOP-99), Promune® (CpG 7909, un agonista sintético para el receptor de tipo toll 9 (TLR9)), terapia con interleucina 2 (IL-2), terapia con IL-12, terapia con IL-15 y terapia con IL-21; y cualquiera de sus combinaciones; en el que el medicamento se usará antes, durante o después del tratamiento del sujeto con la otra terapia contra el cáncer o, en el caso de terapias de combinación múltiples, antes, durante o después del tratamiento del sujeto con las otras terapias contra el cáncer.

En algunas formas de realización, la presente descripción proporciona el uso del anticuerpo monoclonal anti CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno en la fabricación de un medicamento para tratar una leucemia relacionada con células B, por ejemplo la leucemia linfocítica aguda de células B (B-ALL), en un sujeto, en el que el medicamento está coordinado con el tratamiento con al menos otra terapia contra el cáncer seleccionada del grupo constituido por quimioterapia y terapia antimetabolitos, en el que el medicamento se usará antes, durante o después del tratamiento del sujeto con la otra terapia contra el cáncer o, en el caso de terapias de combinación múltiples, antes, durante o después del tratamiento del sujeto con las otras terapias contra el cáncer. Los ejemplos de tales formas de realización incluyen, pero no se limitan a, los casos en los que el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno está coordinado con el tratamiento con un agente quimioterapéutico o antimetabolito seleccionado del grupo constituido por citoxan, doxorubicina, vincristina, prednisona, citarabina, mitoxantrona, idarubicina, asparaginasa, metotrexato, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, y sus combinaciones; en el que el medicamento se usará antes, durante o después del tratamiento del sujeto con la otra terapia contra el cáncer o, en el caso de terapias de combinación múltiples, antes, durante o después del tratamiento del sujeto con las otras terapias contra el cáncer. En uno de tales ejemplos, el medicamento está coordinado con el tratamiento con citarabina más daunorubicina, citarabina más mitoxantrona, y/o citarabina más idarubicina; en el que el medicamento se usará antes, durante o después del tratamiento del sujeto con B-ALL con la otra terapia contra el cáncer o, en el caso de terapias de combinación múltiples, antes, durante o después del tratamiento del sujeto con las otras terapias contra el cáncer.

También se da a conocer en el presente documento el uso de un anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 que se dan a conocer en el presente documento, o su fragmento de unión al antígeno en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto por cáncer caracterizado por crecimiento de células B neoplásicas, incluidos los cánceres relacionados con células B descritos anteriormente en el presente documento, en el que el medicamento se usa en un sujeto que ha recibido tratamiento previo con al menos otra terapia contra el cáncer. Por “pretratado” o “tratamiento previo” se entiende que el sujeto ha recibido otra u otras terapias contra el cáncer (es decir, ha sido tratado con al menos otra terapia contra el cáncer) antes de recibir el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno. “Pretratado” o “tratamiento previo” incluye sujetos que han sido tratados con al menos otra terapia contra el cáncer en el plazo de 2 años, en el plazo de 18 meses, en el plazo de 1 año, en el plazo de 6 meses, en el plazo de 2 meses, en el plazo de 6 semanas, en el plazo de 1 mes, en el plazo de 4 semanas, en el plazo de 3 semanas, en el plazo de 2 semanas, en el plazo de 1 semana, en el plazo de 6 días, en el plazo de 5 días, en el plazo de 4 días, en el plazo de 3 días, en el plazo de 2 días, o incluso en el plazo de 1 día antes del inicio del tratamiento con el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 que se dan a conocer en el presente documento, o su fragmento de unión al antígeno. No es necesario que el

5 sujeto haya sido un paciente que responde al tratamiento previo con la anterior terapia contra el cáncer, o anteriores terapias contra el cáncer. Por consiguiente, el sujeto que recibe el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno podría haber respondido, o podría no haber respondido (es decir el cáncer era refractario), al tratamiento previo con la anterior terapia contra el cáncer, o a una o más terapias anteriores contra el cáncer donde el tratamiento previo comprendía múltiples terapias contra el cáncer. Los ejemplos de otras terapias contra el cáncer para las que un sujeto puede haber recibido tratamiento previo antes de recibir el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno incluyen, pero no se limitan a, cirugía; terapia con radiación; quimioterapia; opcionalmente en combinación con trasplante autólogo de médula ósea, en las que los agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, los presentados en el presente documento anteriormente; otras terapias contra el cáncer con anticuerpos monoclonales incluidas, pero no limitadas a, los anticuerpos anticancerosos presentados en el presente documento anteriormente; terapias contra el cáncer basadas en moléculas pequeñas incluidas, pero no limitadas a, las moléculas pequeñas presentadas en el presente documento anteriormente; terapias contra el cáncer basadas en vacunas/inmunoterapia incluidas, pero no limitadas a, las presentadas en el presente documento anteriormente; terapia con esteroides; otras terapias contra el cáncer; o cualquiera de sus combinaciones.

20 “Tratamiento” en el contexto de uso coordinado de un medicamento descrito en el presente documento con otra u otras terapias contra el cáncer se define en el presente documento como la aplicación o administración del medicamento o de la otra terapia contra el cáncer a un sujeto, o la aplicación o administración del medicamento u otra terapia contra el cáncer a un tejido aislado o línea celular de un sujeto, en el que el sujeto tiene un cáncer caracterizado por el crecimiento de células B neoplásicas, un síntoma asociado con tal cáncer, o una predisposición a desarrollar tal cáncer, siendo la finalidad curar, sanar, calmar, aliviar, alterar, remediar, mejorar o afectar el cáncer, cualquier síntoma asociado del cáncer, o la predisposición a desarrollar el cáncer.

25 Los siguientes ejemplos se ofrecen a manera de ilustración y no como limitación.

Parte experimental

30 Los anticuerpos anti CD40 antagonistas usados en los ejemplos a continuación son CHIR-5.9 y CHIR-12.12. Los anticuerpos anti CD40 CHIR-5.9 y CHIR-12.12 son anticuerpos monoclonales (mAb) anti CD40 humano del subtipo IgG1 humana generados por inmunización de ratones transgénicos que llevan el locus de cadena pesada de IgG1 humana y el locus de cadena ligera κ humana (tecnología XenoMouse®; Abgenix; Fremont, California). Como se muestra por medio del análisis FACS, CHIR-5.9 y CHIR-12.12 se unen específicamente al CD40 humano y pueden prevenir la unión del ligando de CD40. Ambos mAb pueden competir con la unión previa del ligando de CD40 al CD40 de la superficie celular. Ambos anticuerpos son fuertes antagonistas e inhiben la proliferación de las células B normales mediada por el ligando de CD40 *in vitro*, así como de las células cancerosas de pacientes con NHL y CLL. *in vitro*, ambos anticuerpos matan las líneas celulares cancerosas así como las células cancerosas primarias de pacientes con NHL por ADCC. Se observó actividad antitumoral dependiente de la dosis en un modelo de xenoinjerto de linfoma humano. La afinidad de unión de CHIR-5.9 al CD40 humano es de $1,2 \times 10^{-8}$ M y la afinidad de unión de CHIR-12.12 al CD40 humano es de 5×10^{-10} M.

45 La línea de hibridoma de ratón 131.2F8.5.9 (CMCC#12047) y la línea de hibridoma 153.8E2.D10.D6.12.12 (CMCC#12056) se han depositado en la American Type Culture Collection [ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-22209 (EEUU)] bajo Número de Depósito de Patente PTA-5542 y PTA-5543, respectivamente.

Los siguientes protocolos se han usado en los ejemplos que se describen a continuación.

50 *Ensayo ELISA para cuantificación de inmunoglobulinas*

Se estimaron las concentraciones de IgM e IgG humanas por ELISA. Se recubrieron placas de ELISA de 96 pocillos con Mab anti IgG humana de cabra $2 \mu\text{g/ml}$ (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) o con Mab anti IgM humana de cabra $4102 \mu\text{g/ml}$ (Bio Source International, California) en tampón de carbonato 0,05 M (pH 9,6), por incubación durante 16 horas a 4°C . Las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween-20 al 0,05% (PBS-Tween) y se saturaron con BSA durante 1 hora. Tras 2 lavados, las placas se incubaron durante 2 horas a 37°C con diferentes diluciones de las muestras de prueba. Tras 3 lavados, se detectó la Ig unida por incubación durante 2 horas a 37°C con $1 \mu\text{g/ml}$ de Mab anti IgG humana de cabra o Mab anti IgM humana de cabra marcadas con peroxidasa. Las placas se lavaron 4 veces y la actividad peroxidasa unida se reveló por medio de la adición de O-fenilendiamina como sustrato. Se usaron patrones de IgG o IgM humana (Caltag, Burlingame, California) para establecer la curva patrón para cada ensayo.

65 *Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre periférica humana*

Se añadieron 20 ml de disolución de Ficoll-Paque (bajo en endotoxinas; Pharmacia) por tubo de poliestireno de 50 ml, en 3 tubos, 30 minutos antes de añadir la sangre. Se calentó la disolución de Ficoll-Paque hasta temperatura ambiente. Se prepararon 3 litros de lejía en una dilución 1:10 y se usaron para lavar todos los tubos y pipetas en

ES 2 333 971 T3

contacto con la sangre. La sangre se colocó formando una fase en la parte superior de la disolución de Ficoll-Paque sin interrumpir la fase de Ficoll, a 1,5 ml de sangre/1 ml de Ficoll-Paque. Se centrifugaron los tubos a 1700 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente con el freno de la centrífuga desactivado. Se eliminó la mayor cantidad posible de la fase superior (plasma), disminuyendo el vacío al mínimo para evitar retirar la segunda fase de disolución. La segunda fase, que contiene los linfocitos B y T, se recogió usando una pipeta Pasteur estéril, y se colocó en dos tubos de poliestireno de 50 ml. El material recogido se diluyó con 3 x el volumen de RPMI sin aditivos frío, y se centrifugaron los tubos a 1000 rpm durante 10 minutos. Se retiró el medio por aspiración, se resuspendieron las células de ambos tubos de 50 ml en un total de 10 ml de RPMI (sin aditivos) frío y se transfirió a un tubo de 15 ml. Las células se contaron usando un hemocitómetro, a continuación se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos. Se retiró el medio y se resuspendieron las células en 4 ml de RPMI. Esta fracción contenía las PBMC.

Aislamiento de las células B de las PBMC

Se colocaron 100 μ l de Dynabeads (anti-h CD19) en un tubo de plástico de 5 ml. Se añadieron 3 ml de PBS estéril a las perlas y se mezcló, y se colocó en un soporte magnético, a continuación se dejó en reposo durante 2 minutos. Se retiró la disolución usando una pipeta Pasteur. Se añadieron 3 ml de PBS estéril, se mezcló y se colocó en el soporte magnético, a continuación se dejó en reposo durante 2 minutos. Este procedimiento con PBS estéril se repitió una vez más durante un total de 3 lavados. Se añadieron las PBMC en las perlas y se incubó, mezclando, durante 30 minutos a 40°C. El tubo que contenía las PBMC y las perlas se colocó en el soporte magnético durante 2 minutos, a continuación se transfirió la disolución a un nuevo tubo de 5 ml en el soporte magnético. Tras 2 minutos, se transfirió la disolución a un nuevo tubo de 15 ml. Esta etapa se repitió cuatro veces más, y se recogieron las disoluciones de las primeras cuatro veces en el tubo de 15 ml, posteriormente se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos. Esta etapa produjo el sedimento para la separación de las células T.

Se añadieron 100 μ l de RPMI (con aditivos) para recoger las perlas, y se transfirió la disolución a un tubo de 0,7 ml. Se añadieron 10 μ l de perlas Dynal Detacha a la suspensión a temperatura ambiente y se dejó en un agitador de rotación durante 45 minutos. La suspensión se transfirió a un nuevo tubo de 5 ml y se añadieron 3 ml de RPMI (con aditivos). El tubo se colocó en el soporte magnético durante 2 minutos. Se transfirió la disolución a un nuevo tubo de 5 ml y se dejó en el soporte durante 2 minutos, a continuación se colocó en un tubo de 15 ml. La etapa anterior se repitió tres veces más, recogiendo la disolución en el tubo de 15 ml. Se centrifugó el tubo de 15 ml a 1000 rpm durante 10 minutos, y se resuspendieron las células en 10 ml de RPMI. La etapa de lavado se repitió 2 veces más durante un total de 3 lavados. Las células se contaron antes de la última centrifugación. Esta etapa completó la purificación de las células B. Se almacenaron las células en FCS al 90% y DMSO al 10% y se congelaron a -80°C.

Aislamiento de células T

Se preparó la columna de enriquecimiento de células T (R&D systems, kit para columna de anti-h CD 3) usando 20 ml de 1 X tampón de lavado de columna mezclando 2 ml de 10 X tampón de lavado de columna y 18 ml de agua destilada estéril. Se limpió la columna con etanol al 70% y se colocó en la parte superior de un tubo de 15 ml. En primer lugar se retiró el tapón superior de la columna para evitar la entrada de aire en la parte inferior de la columna. A continuación, se retiró el tapón inferior y se limpió la punta con etanol al 70%. Se dejó fluir el líquido dentro de la columna al tubo de 15 ml. Se colocó un nuevo tubo de 15 ml estéril bajo la columna una vez que el tampón había llegado al nivel del filtro blanco. La fracción de PBMC sin las células B se suspendió en 1 ml de tampón y se añadió a la parte superior de la columna. Se dejó incubar las células con la columna a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se eluyeron las células T de la columna con 4 alícuotas de 2 ml cada una de 1 X tampón de lavado de columna. Las células T recogidas se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 10 ml de RPMI. Las células se contaron y se centrifugaron una vez más. Se eliminó el sobrenadante, completando la purificación de las células T. Las células se almacenaron en FCS al 90% y DMSO al 10% y se congelaron a -80°C.

Para los procedimientos anteriores, la composición de RPMI contenía FCS al 10% (inactivado a 56°C durante 45 minutos), Pen/Strep al 1% (Penicilina 100 μ g/ml, Estreptomicina 0,1 μ g/ml), Glutamato al 1%, piruvato de sodio al 1%, 2-ME 50 μ M.

Ensayo de citofluorometría de flujo

Se incubaron células Ramos (10⁶ células/muestra) en 100 μ l de anticuerpo primario (10 μ g/ml en PBS-BSA) durante 20 minutos a 4°C. Tras 3 lavados con PBS-BSA o HBSS- BSA, se incubaron células en 100 μ l de fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos anti IgG humana de cabra marcados con FITC (Caltag) durante 20 minutos a 4°C. Tras 3 lavados con PBS-BSA y 1 lavado con PBS, se resuspendieron las células en 0,5 ml de PBS. Los análisis se realizaron con un FACSCAN V (Becton Dickinson, San Jose, California).

ES 2 333 971 T3

Generación de clones de hibridomas

- Se fusionaron esplenocitos de ratones inmunizados con células de mieloma murino SP 2/0 o P 3 x 63Ag8.653 en una relación de 10:1 usando polietilenglicol al 50% como está descrito previamente por de Boer y col. (1988) J. Immunol. Meth. 113:143. Las células fusionadas se resuspendieron en medio IMDM completo suplementado con hipoxantina (0,1 mM), aminopterina (0,01 mM), timidina (0,016 mM), y hIL-6 0,5 ng/ml (Genzyme, Cambridge, Massachusetts). A continuación se distribuyeron las células fusionadas entre los pocillos de placas de cultivo tisular de 96 pocillos, de manera que cada una contenía 1 hibridoma en crecimiento en promedio.
- Tras 10-14 días se analizaron los sobrenadantes de las poblaciones de hibridomas para detectar la producción de anticuerpos específicos. Para la detección de anticuerpos específicos por los clones de hibridoma, se combinaron los sobrenadantes de cada pocillo y se probaron para especificidad de actividad anti-CD 40 por ELISA en primer lugar. A continuación se usaron los positivos para tinción fluorescente de células de las células B transformadas con VEB como se describió para el ensayo FACS anteriormente. Las células de hibridomas positivos se clonaron dos veces por dilución limitante en IMDM/FBS que contenía hIL-6 0,5 ng/ml.

Ejemplo 1

20 Producción de anticuerpos anti-CD40

- Se generaron varios anticuerpos monoclonales anti CD40 antagonistas del isotipo IgG1, totalmente humanos. Se usaron ratones transgénicos que contienen el locus de cadena pesada de IgG1 humana y el locus de cadena κ humana (Abgenix γ -1 tecnología XenoMouse® (Abgenix; Fremont, California)) para generar estos anticuerpos. Se usaron como inmunógeno células SF9 que expresan el dominio extracelular de CD40. Se fusionó un total de 31 bazos de ratones con las células SP2/0 de mieloma de ratón para generar 895 anticuerpos que reconocen el CD40 recombinante en ELISA (Tablas 1A y 1B). En promedio aproximadamente el 10% de los hibridomas producidos usando tecnología Abgenix XenoMouse® pueden contener la cadena ligera lambda de ratón en lugar de la cadena kappa humana. Se seleccionaron los anticuerpos que contenían cadena ligera lambda de ratón y se descartaron. Se seleccionó una subserie de 260 anticuerpos que también mostraban unión al CD40 de superficie celular para otro análisis. Los hibridomas estables seleccionados durante una serie de procedimientos de subclonación se usaron para más caracterización en ensayos de unión y funcionales.

TABLA 1A

Una fusión típica

Fusión Nº	valor de anti CD40		Nº de pocillos seleccionados	Nº de ELISA+	Nº de superficie celular+
	(1:100 K)	Eficacia de fusión			
153	3	100%	960	123	33
154	4,67	15%	140	0	0
155	6	aprox. 40%	960	3	3
156	3,17	aprox. 25%	220	1	0
157	4,67	90%	960	32	6
158	4,4	90%	960	23	8
159	1,17	100%	960	108	18
160	1,78	90%	960	30	5
Total			6120	320	73

ES 2 333 971 T3

TABLA 1B

Resumen de cuatro series de fusiones

N° de ratones	Hibridomas positivos por ELISA	Hibridomas positivos para superficie celular
31	895	260

TABLA 2

Resumen de la serie de datos inicial con anticuerpos IgG1 anti CD40

Hibridoma madre	Clones de hibridoma	unión a la superficie celular	Antagonista	ADCC	CDC	CMCC#	Secuencia de ADN de la región V
	131.2F5.8.5.1	+++	++	ND	ND	ND	
131.2F5	131.2F5.8.5.9	+++	+++	++	-	12047	Si
	131.2F5.8.5.11	+++	+++	++	-	12055	Si
	153.3C5D8D7.8.4.7.1	++	ND	ND	ND	ND	
153.3C5	153-3C5D8D7.8.4.7.8	++	ND	ND	ND	ND	
	153.3C5D8D7.8.4.7.11	+++	+++	+	ND	ND	
	153.1D2.9.1	+++	ND	ND	ND	12067	
153.1D2	153.1D2.9.8	+++	+++	++	-	12057	
	153.1D2.9.12	+++	ND	ND	ND	12068	
	158.6F3.5.1	+++	+++	++	-	12054	Si
158.6F3	158.6F3.5.7	+++	ND	ND	ND	12061	
	158.6F3.5.10	+++	ND	ND	ND	12062	

ES 2 333 971 T3

Hibridoma madre	Clones de hibridoma	unión a la superficie celular	Antagonista	ADCC	CDC	CMCC#	Secuencia de ADN de la región V
	153.8E2D10D6.12.7	+++	ND	ND	ND	12075	
153.8E2	153.8E2D10D6.12.9	+++	ND	ND	ND	12063	
	153.8E2D10D6.12.12	+++	+++	++++	-	12056	Si
	155.2C2E9F12.2.10,4	+++	+/-	ND	ND	12064	
155.2C2	155.2C2E9F12.2.10,5	+++	ND	ND	ND	12065	
	155.2C2E9F12.2.10,6	+/-	ND	ND	ND	12066	
	166.5E6G12.1	+++	ND	ND	ND	12069	
166.5E6	166.5E6G12.3	+++	ND	ND	ND	12070	
	166.5E6G12.4	+++	+	ND	ND	12071	
177.8C10	177.8C10B3H9	+++	++	ND	ND	ND	
	183.4B3E11.6.1.5	++	ND	ND	ND	ND	
183.4B3	183.4B3E11.6.1.9	++	ND	ND	ND	ND	
	183.4B3E11.6.1.10	+++	++	ND	ND	ND	
	183.2G5D2.8.7	+++	+/-	ND	ND	ND	
183.2G5	183.2GSD2.8.8	+++	ND	ND	ND	ND	
	183.2G5D2.8.9	+++	ND	ND	ND	ND	
	184.6C11D3.2	++	ND	ND	ND	12078	
184.6C11	184.6C11D3.3	++	ND	ND	ND	12080	
	184.6C11D3.6	+/-	+/-	ND	ND	12079	
	185.3E4F12.5.6	+++	ND	ND	ND	12072	
185.3E4	185.3E4F12.5.11	+++	ND	ND	ND	12073	
	185.3E4F12.5.12	+++	+	ND	ND	12074	
	185.1A9E9.6.1	+	ND	ND	ND	ND	
185.1A9	185.1A9E9.6.6	+++	+++	+	ND	ND	
	185.9F1E10,3B5.1	+++	ND	ND	ND	ND	
185.9F11	185.9F11E10,3B5.8	+++	ND	ND	ND	ND	
	185.9F11E10,3B5.12	+++	+++	ND	ND	ND	

Se identificaron clones de 7 hibridomas madre que tenían actividad antagonista. Basado en su potencia antagonista relativa y actividades de ADCC, se seleccionaron dos clones de hibridoma. Sus nombres son: 131.2F8.5.9 (5.9) y 153.8E2.D10,D6.12.12 (12.12).

ES 2 333 971 T3

Se identificaron clones de otros 7 hibridomas que tenían actividad antagonista (Tabla 2 anterior). Basado en su potencia antagonista relativa y actividades de ADCC, se seleccionaron dos clones de hibridoma para otra evaluación. Se denominan 131.2F8.5.9 (5.9) y 153.8E2.D10,D6.12.12 (12.12). El perfil de unión de estos dos anticuerpos a la línea celular de linfoma CD40+ se muestra como un histograma de citometría de flujo en la Figura 1.

5

Ejemplo 2

Secuencias de polinucleótidos y de aminoácido de anticuerpos anti CD40 humanos

10

Los ADNc que codifican las regiones variables de los anticuerpos candidato se amplificaron por PCR, se clonaron y se secuenciaron. Las secuencias de aminoácido para la cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo CHIR-12.12 se presentan en las Figuras 9A y 9B, respectivamente. Véase también SEC ID N° 2 (cadena ligera para mAb CHIR-12.12) y SEC ID N° 4 (cadena pesada para mAb CHIR-12.12). En la Figura 9B se muestra una variante de la cadena pesada para mAb CHIR-12.12 (véase también SEC ID N° 5), que difiere de la SEC ID N° 4 porque tiene un residuo alanina sustituido por un residuo serina en la posición 153 de SEC ID N° 4. Las secuencias de nucleótidos que codifica la cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo CHIR-12.12 se presentan en las Figuras 10A y 10B, respectivamente. Véase también SEC ID N° 1 (secuencia codificadora para cadena ligera para mAb CHIR-12.12) y SEC ID N° 3 (secuencia codificadora para cadena pesada para mAb CHIR-12.12). Las secuencias de aminoácido para la cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo CHIR-5.9 se presentan en las Figuras 11A y 11B, respectivamente. Véase también SEC ID N° 6 (cadena ligera para mAb CHIR-5.9) y SEC ID N° 7 (cadena pesada para mAb CHIR-5.9). En la Figura 11B A se muestra una variante de la cadena pesada para mAb CHIR-5.9 (véase también SEC ID N° 8), que difiere de la SEC ID N° 7 porque tiene un residuo alanina sustituido por un residuo serina en la posición 158 de SEC ID N° 7.

25

Como se espera para los anticuerpos obtenidos de hibridomas independientes, hay una variación sustancial en las secuencias de nucleótidos en las regiones determinantes de complementariedad (CDR). Se cree que la diversidad en la región de CDR3 de V_H determina de manera significativa la especificidad del anticuerpo.

30

Ejemplo 3

Efecto de CHIR-5.9 y CHIR-12.12 en la interacción CD40/CD40L in vitro

35

Los anticuerpos candidatos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 previenen la unión del ligando de CD40 al CD40 de superficie celular y desplazan el ligando de CD40 unido previamente. Se probó la capacidad de los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 para prevenir la unión del ligando de CD40 al CD40 en la superficie de una línea celular de linfoma (Ramos). La unión de ambos anticuerpos (no marcados) evitó la posterior unión del ligando PE-CD40 según se midió por ensayos de citometría de flujo (Figura 2A). En una segunda serie de ensayos se probó la capacidad de los dos anticuerpos para reemplazar el ligando de CD40 unido previamente al CD40 de superficie celular. Ambos anticuerpos fueron eficaces para competir con el ligando de CD40 unido previamente, siendo CHIR-5.9 ligeramente más eficaz que CHIR-12.12 (Figura 2B).

45

Ejemplo 4

CHIR-5.9 y CHIR-12.12 se unen a un epítipo diferente que 15B8 en CD40

50

Los anticuerpos monoclonales candidatos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 compiten uno con el otro por la unión al CD40 pero no con 15B8, un mAb IgG2 anti CD40 (véase documento de Publicación Internacional N° WO 02/28904). Se diseñaron estudios de unión competitiva de anticuerpos usando Biacore con chips biosensores CM5 con proteína A inmovilizada por medio de acoplamiento de aminas, que se usó para capturar anti CD40, CHIR-12.12, o 15B8. Se observaron las curvas de unión de asociación/disociación normales con concentraciones variables de CD40-his (datos no mostrados). Para los estudios de competición, se capturaron CHIR-12.12 o 15B8 en la superficie de la proteína A. Posteriormente se hizo fluir un complejo CD40-his/Fab de CHIR-5.9 (CD40 100 nM; Fab de CHIR-5.9 1 μM), en concentraciones variables, a través de la superficie modificada. En el caso de CHIR-12.12, no se observó asociación del complejo, que indica que CHIR-5.9 bloquea la unión de CHIR-12.12 a CD40-his. Para 15B8, se observó asociación del complejo Fab CHIR-5.9 que indica que CHIR-5.9 no bloquea la unión de 15B8 al sitio de unión de CD40. Sin embargo, la tasa de disociación del complejo aumentó drásticamente (datos no mostrados).

60

También se determinó que 15B8 y CHIR-12.12 no compiten por la unión de CD40-his. Este experimento se llevó a cabo capturando CHIR-12.12 en el chip biosensor de proteína A, bloqueando los sitios residuales de proteína A con hIgG1 control, uniendo CD40-his y a continuación haciendo fluir 15B8 sobre la superficie modificada. 15B8 se unió bajo estas condiciones indicando que CHIR-12.12 no bloquea la unión de 15B8 al CD40.

65

Ejemplo 5

Propiedades de unión de los hibridomas seleccionados

5 Se inmovilizó proteína A en chips biosensores CM5 a través de acoplamiento de aminas. Se capturaron anticuerpos monoclonales anti-CD40 humanos, en una concentración de 1,5 µg/ml, sobre la superficie modificada del biosensor durante 1,5 minutos a 10 µl/min. Se hizo fluir CD40-his recombinante soluble sobre la superficie del biosensor en concentraciones variables. El anticuerpo y el antígeno se diluyeron en HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Tensioactivo P al 20 0,005% (HBS-EP). Se determinaron las constantes cinéticas y de afinidad usando el programa informático Biaevaluation con un ajuste de interacción modelo/global de 1:1.

10 Como se muestra en la Tabla 3 a continuación, hay una diferencia de 121 veces en la tasa de disociación de CHIR-5.9 y CHIR-12.12 que da como resultado una afinidad 24 veces mayor para CHIR-12.12.

Anticuerpo	ka (M-1 seg-1)	kd (seg-1)	KD (nM)
Anti-CD40,CHIR-5.9	$(12,35 \pm 0,64) \times 10^5$	$(15,0 \pm 1,3) \times 10^{-3}$	12,15 ± 0,35
Anti-CD40,CHIR-12.12	$(2,41 \pm 0,13) \times 10^5$	$(1,24 \pm 0,06) \times 10^{-4}$	0,51 ± 0,02

Ejemplo 6

CHIR-5.9 y CHIR-12.12 son potentes antagonistas para la proliferación de linfocitos humanos de sujetos normales mediada por CD40

30 La interacción entre CD40 y el ligando de CD40 induce la proliferación de células B humanas. Se espera que un anticuerpo anti-CD40 antagonista inhiba esta proliferación. Se probó la capacidad de dos anticuerpos candidatos (CHIR-5.9 y CHIR-12.12) para inhibir la proliferación de PBMC de sujetos humanos normales inducida por ligando de CD40. Se usaron células CHO que expresan ligando de CD40 (CD40L) por transfectante fijadas con formaldehído como fuente de ligando de CD40. Se cultivaron PBMC humanas durante 4 días con las usaron células CHO que expresan ligando de CD40 fijadas con formaldehído en presencia de concentraciones variables de mAb anti CD40 CHIR-5.9 o CHIR-12.12. La proliferación se midió por la incorporación de timidina tritiada. Las células se sometieron a pulsos de timidina marcada con tritio a 37°C durante 14-18 horas.

40 Se encontró que ambos anticuerpos eran eficaces para inhibir la proliferación de PBMC humanas inducida por ligando de CD40 (Tabla 4A, mAb CHIR-5.9, Tabla 4B, mAb CHIR-12.12). El experimento se realizó con múltiples donadores de PBMC (n=12 para CHIR-5.9 y n=2 para CHIR-12.12) para asegurar que la inhibición observada no era una peculiaridad de las células de un único donador. Las evaluaciones de seguimiento con otros 4 donadores de PBMC se llevaron a cabo para mAb CHIR-12.12 con tendencias similares observadas. Se usó una amplia variedad de concentraciones de anticuerpo (0,01 µg/ml hasta 100 µg/ml) en estos ensayos. En la mayoría de los casos pudo alcanzarse inhibición prácticamente completa de la proliferación inducida por ligando de CD40 a una concentración de anticuerpos de 0,1 µg/ml. La concentración de anticuerpos (nM) para inhibir el 50% de la proliferación de linfocitos inducida por ligando de CD-40 (CI50) para linfocitos de 6 donadores dio una CI50 promedio (nM) de 47 (DE = 21; donador 1, 24; donador 2, 66; donador 3, 45; donador 4, 84; donador 5, 30; donador 6, 35), que se compara de manera favorable con la CI50 promedio (nM) de 49,65 mostrada en la Tabla 4B. En base a la serie de datos actuales, ambos anticuerpos candidatos parecen similares en su potencia para inhibir la proliferación de PBMC normales inducida por ligando de CD40.

TABLA 4A

Efecto del mAb CHIR-5.9 en la proliferación de PBMC inducida por CD40L

Exp N°	PBMC solas	CHO-CD40L sola	PBMC+ CHO-CD40L	Conc. Ab. (µg/ml)	hulgG1		CHIR-5.9	
					CPM	% de inhibición	CPM	% de inhibición
PBMC-010	1851	121	4436	1	5080	-26	2622	74
	1851	121	4436	0,25	5498	-43	2907	62
	1851	121	4436	0,0625	6029	-65	2619	74

ES 2 333 971 T3

TABLA 4A (continuación)

Exp N°	PBMC solas	CHO- CD40L sola	PBMC+ CHO- CD40L	Conc. Ab. (µg/ml)	hulgG1		CHIR-5.9			
					CPM	% de inhibición	CPM	% de inhibición		
	1851	121	4436	0,0156	5814	-56	1199	131		
PBMC- 011	Donador N°1	2162	178	8222	10	13137	-84	2252	101	
		2162	178	8222	1	11785	-61	1438	115	
		2162	178	8222	0,1	10758	-43	1249	119	
		2162	178	8222	0,01	11322	-53	4705	60	
	Donador N°2	2216	294	7873	10	16679	-164	2362	103	
		2216	294	7873	1	14148	-117	1202	124	
		2216	294	7873	0,1	12422	-85	756	133	
		2216	294	7873	0,01	13870	-112	6606	24	
		Donador N°3	2396	241	11021	10	11641	-7	2631	100
			2396	241	11021	1	13528	-30	1450	114
	2396		241	11021	0,1	12176	-14	990	120	
	Donador N°4	2396	241	11021	0,01	11895	-10	5357	68	
4552		133	15301	10	22098	-64	3768	109		
4552		133	15301	1	19448	-39	2040	125		
4552		133	15301	0,1	18398	-29	1728	128		
4552		133	15301	0,01	22767	-70	9481	55		
PBMC- 012		777	117	6041	10	7327	-25	2150	76	
	777	117	6041	1	6212	-3	1550	87		
	777	117	6041	0,1	7006	-19	828	101		
	777	117	6041	0,01	7524	-29	1213	94		
PBMC- 014	1857	73	7889	100	9399	-25	3379	76		
	1857	73	7889	20	8120	-4	3870	67		
	1857	73	7889	4	8368	-8	2552	90		
	1857	73	7889	0,8	9564	-28	1725	103		
PBMC- 015	Donador N°1	3203	127	10485	100	15425	-69	1497	126	
		3203	127	10485	20	11497	-14	1611	124	
		3203	127	10485	4	11641	-16	1359	128	
		3203	127	10485	0,8	12807	-32	1490	126	
	Donador N°2	3680	175	15145	100	21432	-56	1792	118	
		3680	175	15145	20	16998	-16	1779	118	
		3680	175	15145	4	17729	-23	1965	117	
		3680	175	15145	0,8	17245	-19	2217	115	
	Donador N°3	2734	152	19775	100	22967	-19	1664	107	
		2734	152	19775	20	21224	-9	1848	106	
		2734	152	19775	4	20658	-5	1534	108	
		2734	152	19775	0,8	18923	5	1262	110	
PBMC- 016	1118	36	13531	0,1	10928	21	745	103		
	1118	36	13531	0,05	11467	17	962	102		
	1118	36	13531	0,01	11942	13	3013	85		
PBMC- 017	962	75	12510	1	13597	-9	258	107		
Promedio del % de inhibición de PBMC humanas a 100 µg/ml							-42	107		
Promedio del % de inhibición de PBMC humanas a 10 µg/ml							-69	98		
Promedio del % de inhibición de PBMC humanas a 1 µg/ml							-41	107		
Promedio del % de inhibición de PBMC humanas a 0,1 µg/ml							-28	117		
Promedio del % de inhibición de PBMC humanas a 0,01 µg/ml							-44	64		
Promedio del % de inhibición de PBMC humanas							-35	101		
% de inhibición: 100-(CPM con Abs-PBMC solas-CHO-CD40L solas)/(CPM de PBMC+CHO-CD40L-PBMC solas-CHO-CD40L solas)*100%										

Tabla 4B. Efecto del mAB CHIR-12.12 en la proliferación de PBMC inducida por CD40L									
Exp N°	PBMC solas	CHO-CD40L solas	PBMC+ CHO-CD40L	Conc. Ab (µg/ml)	HulGG1		CHIR-12.12		
					CPM	% de inhibición	CPM	% de inhibición	
PBMC-025	Donador N°1	4051	42292	0,1	33354	23	440	110	
		4051	42292	0,01	37129	14	8696	88	
		4051	42292	0,001	40271	5	32875	25	
		4051	42292	0,0001	40034	6	37261	13	
PBMC-026	Donador N°1	2260	14987	0,1	15767	-6	365	115	
		2260	14987	0,01	17134	-17	6734	65	
		2260	14987	0,001	20142	-41	16183	-9	
		2260	14987	0,0001	17847	-23	16187	-9	
PBMC-026	Donador N°1	2039	19071	0,1	17136	11	624	109	
		2039	19071	0,01	16445	15	6455	74	
		2039	19071	0,001	16195	17	17833	7	
		2039	19071	0,0001	18192	5	17924	7	
PBMC-026	Donador N°2	2016	17834	0,1	17181	4	2078	100	
		2016	17834	0,01	16757	7	10946	44	
		2016	17834	0,001	18613	-5	17924	-1	
		2016	17834	0,0001	17169	4	18569	-5	

ES 2 333 971 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

PBMC-028	Donador N°1	4288	45	22547	1	18204	24	2098	112	
		4288	45	22547	0,1	20679	10	1827	114	
		4288	45	22547	0,01	22799	-1	6520	88	
		4288	45	22547	0,001	23547	-5	22327	1	
		4288	45	22547	0,0001	24778	-12	24124	-9	
										30,07
PBMC-029	Donador N°1	609	69	10054	0,1	11027	-10	2098	85	
		609	69	10054	0,01	10037	0	1827	88	
		609	69	10054	0,001	10222	-2	6520	38	
		609	69	10054	0,0001	11267	-13	22327	-131	
										28,06
PBMC-030	Donador N°1	2739	47	53426	0,1	60116	-13	2132	101	
		2739	47	53426	0,01	56411	-6	14297	77	
		2739	47	53426	0,001	59167	-11	55868	-5	

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

	2739	47	53426	0,0001	59290	-12	60865	-15	35,52
Donador	4310	50	53781	0,1	52881	2	3208	102	
Nº2									
	4310	50	53781	0,01	51741	4	30716	47	
	4310	50	53781	0,001	53072	1	53628	0	
	4310	50	53781	0,0001	58045	-9	54343	-1	102,88
PBMC-032	2458	42	14058	0,1	16579	-22	636	116	40,36
	2458	42	14058	0,01	19250	-45	3358	93	
	2458	42	14058	0,001	19852	-50	20639	-57	
	2458	42	14058	0,0001	19161	-44	18907	-42	
Promedio de % de inhibición de PBMC humanas a 0,1 µg/ml						3		107	
Promedio de % de inhibición de PBMC humanas a 0,01 µg/ml						-1		74	
Promedio de % de inhibición de PBMC humanas a 0,001 µg/ml						-7		0	
Promedio de % de inhibición de PBMC humanas a 0,0001 µg/ml						-8		-17	49,65
% de inhibición: 100 - (CPM con Abs - PBMC solas - CHO - CD40L solas)/(CPM de PBMC + CHO - CD40L - PBMC solas - CHO - CD40L solas) * 100%									

ES 2 333 971 T3

Además de las células B, las PBMC humanas también contienen células citolíticas naturales que pueden mediar la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC). Para aclarar el mecanismo de inhibición de la proliferación mediada por anticuerpos, se realizaron ensayos con células B purificadas de PBMC humanas. De manera similar a los resultados obtenidos con PBMC, ambos anticuerpos inhibieron de manera potente la proliferación de células B purificadas inducida por ligando de CD40 (Tabla 5, n = 3). Estos datos demuestran que la actividad antagonista de los anticuerpos candidatos, y no el mecanismo de ADCC, es la causa de la inhibición de la proliferación en estos ensayos.

10

(Tabla pasa a página siguiente)

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 5. Efecto de anticuerpos anti CD40 en la proliferación de células B humanas purificadas inducida por ligando de CD40

Exp N°	Donador N°	CPM			Conc. Ab (µg/ml)	HulG1		CHIR-5.9		CHIR-5.9	
		Células B	CHO-CD40L	Cél. B + CHO - CD40L		CPM	% de inhibición	CPM	% de inhibición	CPM	% de inhibición
Célula B-004	1	418	89	3132	100	429	103	271	109	152	114
		418	89	3132	20	3193	-2	316	107	222	111
		418	89	3132	4	3175	-2	144	114	235	110
		418	89	3132	0,8	6334	-122	245	110	63	117
	2	81	73	27240	100	28311	-4	85	100	77	100
		81	73	27240	20	24707	9	65	100	94	100
		81	73	27240	4	23081	15	108	100	68	100
		81	73	27240	0,8	26252	4	87	100	77	100
	3	267	75	24552	1	25910	-6	291	100	102	101
		267	75	24552	0,1	28447	-16	259	100	108	101
		267	75	24552	0,01	26706	-9	2957	89	4922	81
Inhibición promedio	%						-3		103		103
% de inhibición: 100 - (CPM con Ab -células B solas - CHO - CD40L solas)/(CPM de célula B + CHO - CD40L solas) * 100%											

ES 2 333 971 T3

Ejemplo 7

CHIR-5.9 y CHIR-12.12 no inducen fuerte proliferación de células B humanas de sujetos normales

5 El ligando de CD40 activa la proliferación de células B normales y células B de linfoma de células B. La unión de algunos anticuerpos anti-CD40 (agonistas) puede proporcionar una señal estimuladora similar para la proliferación de células B normales y cancerosas. Los anticuerpos con fuerte actividad estimuladora de células B no son candidatos adecuados para el tratamiento terapéutico de linfoma de células B. Se probó la capacidad de los dos anticuerpos candidatos para inducir la proliferación de células B de donadores voluntarios normales. Las células B purificadas por medio de centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque Plus de PBMC de donadores normales se cultivaron en placas de 96 pocillos con concentraciones variables de los anticuerpos candidatos (intervalo de 0,001 hasta 100 $\mu\text{g/ml}$) durante un total de 4 días. En el grupo de control positivo, las PBMC se cultivaron con células CHO que expresan ligandos de CD40 fijadas con formaldehído. La proliferación de células B se midió por la incorporación de timidina marcada con tritio a 37°C durante 14-18 horas. Mientras que el ligando de CD40 presentado en las células CHO indujo potente proliferación de células B que dio un índice de estimulación (IE) promedio de 145, los anticuerpos candidatos indujeron sólo una débil proliferación con un índice de estimulación de 2,89 y 5,08 para CHIR-12.12 y CHIR-5.9, respectivamente (n = 3) (Tabla 6).

20

(Tabla pasa a página siguiente)

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 6. Proliferación de células B purificadas de sujetos humanos normales en respuesta a los mAb anti CD40 candidatos

Exp N°	Donador N°	Células B		Células B+CHO-CD40L		Conc. Ab (µg/ml)	Células B+hulgG1		Células B+CHIR-5.9		Células B+CHIR-12.12	
		CPM	Índice de E. (1)	CPM	Índice de E. (1)		CPM	Índice de E. (2)	CPM	Índice de E. (2)	CPM	Índice de E. (2)
Célula B Congelada	1	418	3132	7,49	100	498	1,19	401	0,96	458	1,10	
		418	3132	20	20	245	0,59	232	0,56	370	0,89	
		418	3132	4	4	241	0,58	232	0,56	211	0,50	
		418	3132	0,8	0,8	376	0,90	298	0,71	230	0,55	
Congelada	2	81	27240	336,30	100	34	0,42	454	5,60	122	1,51	
		81	27240	20	20	48	0,59	706	8,72	255	3,15	
		81	27240	4	4	41	0,51	567	7,00	367	4,53	
		81	27240	0,8	0,8	34	0,42	736	9,09	408	5,04	
Célula B-005		267	24552	91,96	1	691	2,59	2101	7,87	1223	4,58	
		267	24552	0,1	0,1	686	2,57	2267	8,49	1557	5,83	
		267	24552	0,01	0,01	808	3,03	2203	8,25	1027	3,85	
		267	24552	0,001	0,001	567	2,12	846	3,17	826	3,09	
Índice de estimulación (IE) promedio				145,25			1,29		5,08		2,88	
Índice de E. (1): = CPM (Células B +CHO-CD40L)/CPM (células B solas) Índice de E. (2): = CPM (Células B +Ab)/CPM (PBMC solas)												

ES 2 333 971 T3

Además de células B, las PBMC humanas contienen tipos de células que llevan receptores Fc (FcR) para moléculas de IgG1 que pueden proporcionar entrecruzamiento de anticuerpos anti CD40 unidos a CD40 en células B. Este entrecruzamiento podría aumentar potencialmente la actividad estimuladora de los anticuerpos anti CD40. Para confirmar la ausencia de actividad estimuladora de células B de los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 en presencia de células entrecruzadas, se realizaron experimentos de proliferación con PBMC totales conteniendo células B así como células FcR+. Los datos de estos experimentos (Tabla 7A, mAb CHIR-5.9; Tabla 7B, mAb CHIR-12.12) confirman que estos anticuerpos candidatos, incluso en presencia de células que llevan FcR, en general no estimulan la proliferación de las células B más allá de la proliferación de fondo inducida por la IgG1 humana de control (n=10). El ligando de CD40 indujo un índice de estimulación (IE) promedio de 7,41. El IE promedio con los anticuerpos candidatos fue de 0,55 y 1,05 para CHIR-12.12 y CHIR-5.9, respectivamente. Sólo una de las 10 PBMC de los donadores probadas mostró respuesta estimuladora para el anticuerpo CHIR-5.9 (donador N° 2 en la Tabla 7). La ausencia de actividad estimuladora por los mAb candidatos se confirmó además por medio de la medición de la proliferación de PBMC en respuesta a los anticuerpos anti CD40 candidatos inmovilizados en la superficie de plástico de los

15

TABLA 7A

20

Proliferación de PBMC de sujetos humanos normales en respuesta al mAb CHIR-5.9

25

Exp N°	PBM C	PBMC+CHO- CD40L		Conc. Ab (µg/ml)	PBMC+hulG1		PBMC+CHIR-5.9	
		CPM	índice(1)		CPM	índice(2)	CPM	índice(2)
PBMC- 10							597	
	1417	5279	3,73	1	1218	0,86	3	4,22
							481	
	1417	5279		0,25	1712	1,21	5	3,40
				0,062			364	
40	1417	5279		5	1449	1,02	2	2,57
				0,015			324	
	1417	5279		56	1194	0,84	2	2,29
PBMC- 11							317	

50

55

60

65

ES 2 333 971 T3

Exp N°	PBM C	PBMC+CHO- CD40L		Conc. Ab (µg/ml)	PBMC+hulgG1		PBMC+CHIR-5.9		
		CPM	índice(1)		CPM	índice(2)	CPM	índice(2)	
	Donador								
	N°1	2138	8247	3,86	10	3047	1,43	7	1,49
								361	
		2138	8247		1	2726	1,28	7	1,69
								201	
		2138	8247		0,1	2026	0,95	1	0,94
								186	
		2138	8247		0,01	2424	1,13	0	0,87
	Donador								
	N°2		1156					452	
		2374	1	4,87	10	4966	2,09	3	1,91
			1156					244	
		2374	1		1	2544	1,07	5	1,03
			1156					146	
		2374	1		0,1	2177	0,92	2	0,62
			1156					189	
		2374	1		0,01	4672	1,97	6	0,80
								211	
	Donador								
	N°3	3229	7956	2,46	10	5035	1,56	9	0,66
								109	
		3229	7956		1	2826	0,88	9	0,34
								105	
		3229	7956		0,1	2277	0,71	2	0,33
								189	
		3229	7956					9	0,59
			1431					517	
	Donador								
	N°4	4198	4	3,41	10	5012	1,19	6	1,23
			1431					470	
		4198	4		1	3592	0,86	2	1,12
			1431					431	

ES 2 333 971 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Exp N°	PBM C	PBMC+CHO- CD40L		Conc. Ab (µg/ml)	PBMC+hulgG1		PBMC+CHIR-5.9		
		CPM	índice(1)		CPM	índice(2)	CPM	índice(2)	
	4198	4	0,1	5298	1,26	9	1,03		
		1431					540		
	4198	4	0,01	5758	1,37	0	1,29		
PBMC-									
	014						247		
	2350	8787	3,74	100	2722	1,16	1	1,05	
							244		
	2350	8787		20	2315	0,99	7	1,04	
							165		
	2350	8787		4	2160	0,92	9	0,71	
							167		
	2350	8787		0,8	2328	0,99	1	0,71	
PBMC-									
	015						168		
		1293							
	Donador								
	N°1	3284	6	3,94	100	3598	1,10	2	0,51
			1293					156	
		3284	6	20	2751	0,84	2	0,48	
			1293					110	
		3284	6	4	3135	0,95	5	0,34	
			1293					141	
		3284	6	0,8	4027	1,23	9	0,43	
			1912					510	
	Donador								
	N°2	6099	1	3,14	100	2999	0,49	4	0,84
			1912					391	
		6099	1		20	4025	0,66	7	0,64
			1912					334	
		6099	1		4	4496	0,74	1	0,55
			1912					413	
		6099	1		0,8	3834	0,63	9	0,68
			1982					120	

ES 2 333 971 T3

Exp N°	Donador	PBM C	PBMC+CHO-CD40L		Conc. Ab (µg/ml)	PBMC+hulgG1		PBMC+CHIR-5.9	
			CPM	índice(1)		CPM	índice(2)	CPM	índice(2)
	N°3	2479	6	8,00	100	3564	1,44	4	0,49
			1982						
		2479	6		20	1874	0,76	782	0,32
			1982						
		2479	6		4	1779	0,72	634	0,26
			1982						
		2479	6		0,8	2274	0,92	937	0,38
	PBMC-016		1578					103	
		1148	9	13,75	0,1	1255	1,09	6	0,90
			1578						
		1148	9		0,05	1284	1,12	871	0,76
			1578						
		1148	9		0,01	1446	1,26	952	0,83
	IE promedio de PBMC			5,09			1,06		1,03
	Índice(1): = (PBMC+CHO-CD40L)/PBMC								
	Índice(2): = (PBMC+Ab)/PBMC								

TABLA 7B

Proliferación de PBMC de sujetos humanos normales en respuesta al mAb CHIR-12.12

Exp N°	Donador	PBMC	PBMC+CHO-CD40L		Conc. Ab (µg/ml)	PBMC+hulgG1		PBMC+CHIR-12.12	
			CPM	índice (1)		CPM	índice (2)	CPM	índice (2)
	N°1	4051	42292	10,44	0,1	2909	0,72	2451	0,61
		4051	42292		0,01	4725	1,17	8924	2,20
		4051	42292		0,001	8080	1,99	8782	2,17
		4051	42292		0,0001	4351	1,07	4342	1,07
	N°2	2260	14987	6,63	0,1	2538	1,12	6741	2,98
		2260	14987		0,01	3524	1,56	8921	3,95

ES 2 333 971 T3

Exp N°		PBMC	PBMC+CHO-CD40L		Conc. Ab (µg/ml)	PBMC+hulgG1		PBMC+CHIR-12.12	
			CPM	índice (1)		CPM	índice (2)	CPM	índice (2)
		2260	14987		0,001	3159	1,40	4484	1,98
		2260	14987		0,0001	2801	1,24	2533	1,12
PBMC-026	Donador N°1	2085	18313	8,78	0,1	1386	0,66	2761	1,32
		2085	18313		0,01	2871	1,38	3162	1,52
		2085	18313		0,001	2602	1,25	3233	1,55
		2085	18313		0,0001	1709	0,82	1766	0,85
	Donador N°2	676	18054	26,71	0,1	660	0,98	2229	3,30
		676	18054		0,01	2864	4,24	1238	1,83
		676	18054		0,001	693	1,03	1507	2,23
		676	18054		0,0001	984	1,46	811	1,20
PBMC-027	Donador N°1	2742	13028	4,75	0,1	4725	1,72	2795	1,02
		2742	13028		0,01	4575	1,67	5353	1,95
		2742	13028		0,001	3218	1,17	3501	1,28
		2742	13028		0,0001	5107	1,86	4272	1,56
	Donador N°2	1338	11901	8,89	0,1	1633	1,22	1943	1,45
		1338	11901		0,01	1520	1,14	5132	3,84
		1338	11901		0,001	1517	1,13	2067	1,54
		1338	11901		0,0001	1047	0,78	2076	1,55
PBMC-028	Donador N°1	4288	22547	5,26	0,1	3686	0,86	2525	0,59
		4288	22547		0,01	3113	0,73	2047	0,48
		4288	22547		0,001	4414	1,03	3515	0,82
		4288	22547		0,0001	2452	0,57	4189	0,98
	Donador N°2	2148	54894	25,56	0,1	9127	4,25	5574	2,59
		2148	54894		0,01	4566	2,13	6515	3,03
		2148	54894		0,001	5285	2,46	5919	2,76
		2148	54894		0,0001	4667	2,17	4298	2,00

ES 2 333 971 T3

Exp N°	PBMC	PBMC+CHO-CD40L		Conc. Ab (µg/ml)	PBMC+hulgG1		PBMC+CHIR-12.12		
		CPM	índice (1)		CPM	índice (2)	CPM	índice (2)	
PBMC-029	Donador N°1	609	10054	16,51	0,1	359	0,59	363	0,60
		609	10054		0,01	473	0,78	956	1,57
		609	10054		0,001	461	0,76	1159	1,90
		609	10054		0,0001	625	1,03	558	0,92
	Donador N°2	7737	23132	2,99	0,1	4940	0,64	3493	0,45
		7737	23132		0,01	6041	0,78	3644	0,47
		7737	23132		0,001	5098	0,66	5232	0,68
		7737	23132		0,0001	5135	0,66	5241	0,68
PBMC-030	Donador N°1	4164	57205	13,74	10	2713	0,65	1046	0,25
		4164	57205		1	3627	0,87	1576	0,38
		4164	57205		0,1	4590	1,10	1512	0,36
		4164	57205		0,01	4384	1,05	2711	0,65
	Donador N°2	3324	53865	16,20	10	6376	1,92	4731	1,42
		3324	53865		1	4720	1,42	5219	1,57
		3324	53865		0,1	3880	1,17	5869	1,77
		3324	53865		0,01	3863	1,16	5657	1,70
PBMC-026	Donador N°1	1808	15271	8,45	10	2349	1,30	4790	2,65
		1808	15271		1	3820	2,11	5203	2,88
		1808	15271		0,1	2098	1,16	6332	3,50
		1808	15271		0,01	1789	0,99	5005	2,77
IE promedio de PBMC				11,92			1,30		1,62
Índice(1): = CPM de (PBMC+CHO-CD40L)/CPM de PBMC									
Índice(2): = CPM de (PBMC+Ab)/CPM de PBMC									

60 pocillos de cultivo (n = 2). El IE promedio con estimulación con ligando de CD40, CHIR-12.12 y CHIR-5.9 fue de 22, 0,67 y 1,2, respectivamente (Tabla 8). Tomados juntos, estos datos muestran que los anticuerpos anti CD40 candidatos no tienen fuertes propiedades estimuladoras de las células B.

65

Tabla 8. Proliferación de PBMC de sujetos humanos normales en respuesta a anticuerpos anti CD40 inmovilizados

Exp N°	PBMC		PBMCCHO-CD40L		Conc. Ab (µg/ml)	PBMC+huIgG1		PBMC+CHIR-5.9		PBMC+CHTR-12.12	
	CPM	Índice E. (1)	CPM	Índice E. (1)		CPM	Índice E. (1)	CPM	Índice E. (2)	CPM	Índice E. (2)
PBMC-012	225	6808	30,26	10	10	279	1,24	734	3,26	200	0,89
	225	6808		1	1	175	0,78	178	0,79	161	0,72
	225	6808		0,1	0,1	156	0,69	226	1,00	249	1,11
	225	6808		0,01	0,01	293	1,30	232	1,03	254	1,13
Immobilize-004	857	11701	13,65	1000	1000	479	0,56	1428	1,67	384	0,45
	857	11701		100	100	543	0,63	839	0,98	265	0,31
	857	11701		10	10	487	0,57	411	0,48	262	0,31
	857	11701		1	1	632	0,74	372	0,43	376	0,44
Índice de estimulación promedio						21,96		0,81		1,21	0,67
Índice (1): = CPM (PBMC+CHO-CD40L)/CPM (PBMC)											
Índice (2): = CPM (PBMC+mAbs)/CPM (PBMC)											

ES 2 333 971 T3

Ejemplo 8

CHIR-5.9 y CHIR-12.12 son capaces de causar citolisis de células diana que llevan CD40 por ADCC

5 Los anticuerpos candidatos pueden causar citolisis de células diana que llevan CD40 (líneas de linfoma) mediante el mecanismo de ADCC. Tanto CHIR-5.9 como CHIR-12.12 son anticuerpos de isotipo IgG1 totalmente humanos y se esperan que tengan la capacidad para inducir la citolisis de células diana mediante el mecanismo de ADCC. Se probó su capacidad para causar citolisis de líneas celulares cancerosas en ensayos *in vitro*. Se seleccionaron dos líneas celulares de linfoma humanas (Ramos y Daudi) como células diana para estos ensayos. Se usaron PBMC o
10 células NK enriquecidas de 8 donadoras voluntarios normales como células efectoras en estos ensayos. Se observó una respuesta de ADCC más potente con CHIR-12.12 comparado con CHIR-5.9 frente a las células diana de ambas líneas celulares cancerosas de linfoma. Las líneas celulares de linfoma también expresan CD20, el antígeno diana para rituximab (Rituxan®), que hizo posible la comparación de la actividad ADCC de estos dos mAb candidatos con la actividad de ADCC de rituximab. Para la diana de línea celular de linfoma, se observó una lisis específica promedio de
15 35%, 59% y 47% para CHIR-5.9, CHIR-12.12, y rituximab, respectivamente, cuando se usaron en una concentración de 1 µg/ml (Tabla 9). Los dos anticuerpos no mostraron mucha actividad en los ensayos de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

TABLA 9

Citolisis de líneas celulares de linfoma dependiente del mAb anti CD40 por ADCC

Citolisis de líneas celulares de linfoma dependiente del mAb anti CD40 por ADCC										
Exp N°	Célula efectora	Relación E:D	Células diana: Línea celular de linfoma humano (Ramos o Daudi)							
			lisis IgG1 %	Conc. Ab (µg/ml)	CHIR-5.9		CHIR-12.12		Rituxan	
					lisis %	lisis IgG1 %	lisis %	lisis %² IgG1	lisis %	lisis IgG1 %
ADCC-005	huNK	3	17,05	5	30,75	13,70	65,22	48,17	ND	ND
Alarmor Blue	huNK	3	40,81	5	58,62	17,81	87,87	47,06	ND	ND

ES 2 333 971 T3

Citólisis de líneas celulares de linfoma dependiente del mAb anti CD40 por ADCC											
Exp N°	Célula efectora	Relación E:D	Células diana: Línea celular de linfoma humano (Ramos o Daudi)								
			lisis IgG1 %	Conc. Ab (µg/ml)	CHIR-5.9		CHIR-12.12		Rituxan		
					lisis %	lisis IgG1 %	lisis %	lisis % ² IgG1	lisis %	lisis % ² IgG1	
ADCC-005	huNK	2	-3,09	10	3,50	6,59	43,71	46,8	34,82	37,91	
Alarmor Blue			-8,62	1	-10,10	-1,48	45,13	53,75	37,07	45,69	
			-11	0,1	-14,80	-3,80	39,82	50,82	33,61	44,61	
51Cr	huNK	5	-4,54	0,01	2,53	7,07	50,07	54,61	28,49	33,03	
			1,5	10	32,09	30,59	47,24	45,742	ND	ND	
			2,4	1	18,01	15,61	37,42	35,022	ND	ND	
			2,5	0,1	14,67	12,17	37,63	35,131	ND	ND	
ADCC-009	huNK	10	2,32	5	66,20	63,88	97,70	95,38	86,2	83,88	
Calceína AM			0,48	1	67,20	66,72	123,00	122,52	88,2	87,72	
			-1,43	0,2	78,40	79,83	118,00	119,43	88,8	90,23	
			3,39	0,04	69,10	65,71	109,00	105,61	84,9	81,51	
ADCC-011	huNK	8	3,18	1	15,36	12,19	51,59	48,42	22,44	19,27	
Calceína AM			4,58	0,01	7,39	2,81	46,80	42,22	14,68	10,10	
			5,41	0,002	6,35	0,94	5,10	-0,31	9,58	4,16	
			7,03	0,0004	7,76	0,73	5,99	-1,04	5,99	-1,04	
ADCC-012	huNK	10	13,34	10	73,31	59,97	117,80	104,46	50,75	37,41	
Calceína AM			13,50	1	74,76	61,26	88,64	75,14	65,97	52,47	
			12,27	0,01	58,52	46,25	72,88	60,61	50,16	37,89	
			13,61	0,005	57,50	43,89	69,45	55,84	39,28	25,67	

ES 2 333 971 T3

Citólisis de líneas celulares de linfoma dependiente del mAb anti CD40 por ADCC										
Exp N°	Célula efectora	Relación E:D	Células diana: Línea celular de linfoma humano (Ramos o Daudi)							
			lisis IgG1 %	Conc. Ab (µg/ml)	CHIR-5.9		CHIR-12.12		Rituxan	
					lisis %	lisis IgG1 %	lisis %	lisis % ² IgG1 %	lisis %	lisis %
			11,95	0,001	56,81	44,86	65,17	53,22	33,07	21,12
ADCC-013	PBMC	100	2,54	1	21,03	18,49	37,94	35,40	32,28	29,74
			2,45	0,1	15,50	13,05	30,82	28,37	27,18	24,73
			2,92	0,01	14,53	11,61	22,59	19,67	12,79	9,87
			2,78	0,001	3,90	1,12	8,99	6,21	3,13	0,35
ADCC-014	PBM	100	4,64	10	53,54	48,90	56,12	51,48	ND	ND
			4,64	1	46,84	42,20	43,00	38,36	ND	ND
			4,64	0,1	45,63	40,99	39,94	35,30	ND	ND
			4,64	0,01	7,73	3,09	9,79	5,15	ND	ND
			4,64	0,001	8,83	4,19	10,81	6,17	ND	ND
Lisis % promedio en una concentración de mAb de 1 µg/ml						35,31		59,03		47,23
* Las citólisis mayores que el 100% se deben a la citólisis incompleta por el detergente usado para controles de citólisis del 100%.										

Ejemplo 9

CD40 está presente en la superficie de células NHL de las biopsias de ganglios linfáticos de pacientes

5 Se aislaron células de NHL de ganglios linfáticos biopsiados de pacientes y se conservaron en nitrógeno líquido hasta el uso. La viabilidad celular en el momento del análisis era superior al 90%. Las células de dos pacientes sensibles a rituximab y de tres pacientes resistentes a rituximab (cinco pacientes en total) se tiñeron con un 15B8-FTTC marcado directo o con 15B8 más anti-huIgG2-FITC y se analizaron por citometría de flujo. Se encontró que las células de NHL de todos los pacientes expresaban CD40. La Tabla 10 muestra que un promedio de 76% de células de NHL expresan
10 CD40 (un intervalo del 60-91%).

TABLA 10

15

20

25

30

35

40

45

ID del paciente ^a	Tipo de paciente ^b	% positivo ^c	
		MS81 ^d	15B8 ^e
B	CR	n.r. ^f	91,02
J	CR	n.r.	60,36
H	NR	n.r.	85,08
H	NR	72,24	81,19
K	NR	n.r.	70,69
L	NR	n.r.	66,82
% Positivo promedio		76	
^a Pacientes con NHL tratados con mAb anti CD20 ^b respuesta del paciente al mAb anti CD20; CR = paciente con respuesta completa; NR = paciente sin respuesta ^c % de células en ventana de linfocitos con tinción positiva ^d MS81, mAb anti CD40 agonista ^e 15B8, mAb anti CD40 antagonista ^f n.r., no realizado			

Ejemplo 10

50

CHIR-5.9 y CHIR-12.12 no estimulan la proliferación de células cancerosas de ganglios linfáticos de pacientes con NHL

55

60

65

Se sabe que el ligando de CD40 proporciona una señal estimuladora para la supervivencia y la proliferación de las células de linfoma de pacientes con NHL. La unión de ciertos anticuerpos anti CD40 (agonistas) puede proporcionar una señal estimuladora similar para la proliferación de las células cancerosas de los pacientes. Los anticuerpos con fuerte actividad estimuladora de las células B no son candidatos adecuados para el tratamiento terapéutico de los linfomas de células B. Se probó la capacidad de los dos anticuerpos candidatos para inducir la proliferación de células de NHL de 3 pacientes. Se cultivaron las células aisladas de biopsias de ganglios linfáticos (GL) con concentraciones variables de anticuerpos candidatos (intervalo de 0,01 hasta 300 μ /ml) durante un total de 3 días. La proliferación celular se midió por medio de la incorporación de timidina tritiada. Ninguno de los dos mAb candidatos indujo ninguna proliferación de células cancerosas en ninguna concentración probada (Tabla 11). Los anticuerpos, incluso en presencia de IL-4 añadida de manera exógena, un factor de crecimiento, no indujeron la proliferación de las células de NHL (probadas en las células de uno de los tres pacientes). Estos resultados indican que CHIR-5.9 y CHIR-12.12 no son anticuerpos anti CD40 agonistas y que no estimulan la proliferación *in vitro* de las células de NHL de los pacientes.

TABLA 11

Proliferación de células de cáncer de GL de pacientes con NHL en respuesta a los mAb anti-CD40 candidatos

Donador N°	Conc. Ab (µg/ml)	CPM		Índice de Estim.	CPM células + CHIR-12.12	Índice de Estim.	CPM células + MS81	Índice de Estim.
		Células + IgG1	células + CHIR-5.9	CHIR-5.9	CHIR-12.12	CHIR-12.12	MS81	MS81
PP	0,01	180	203	1,23	133,67	0,74	ND	ND
	0,1	107,5	151,67	1,41	136	1,27	ND	ND
	1	130,67	206,67	1,58	197,33	1,51	179	1,37
	10	152,5	245	1,61	137,33	0,90	871,67	5,71
	100	137,67	332,33	2,41	157,33	1,14	ND	ND
	300	137,67	254,33	1,85	100,67	0,73	ND	ND
MM	0,01	165	180,33	1,09	124	0,75	ND	ND
	0,1	180,5	149,67	0,83	111,33	0,62	ND	ND
	1	62	109,67	1,77	104,67	1,69	ND	ND
	10	91,5	93,33	1,02	100	1,09	763	8,34
	100	123	173	1,41	105,33	0,86	ND	ND
	300	109	183,67	1,69	157	1,44	ND	ND
BD (IL-4)	0,01	1591,5	1623,67	1,02	1422	0,89	ND	ND
	0,1	1405	1281	0,91	1316,33	0,94	ND	ND
	1	1526	1352,33	0,89	1160	0,76	1508,33	0,99
	10	1450	1424	0,98	1244	0,86	4146,67	2,86
	100	1406,67	1497,67	1,06	1255,33	0,89	ND	ND
	300	1410,33	1466,67	1,04	1233	0,87	ND	ND

Ejemplo 11

CHIR-5.9 y CHIR-12.12 pueden bloquear la proliferación mediada por ligandos de CD40 de células cancerosas de pacientes con linfoma no Hodgkin

La interacción entre CD40 y el ligando de CD40 induce la proliferación de células cancerosas de pacientes con NHL. Se espera que un anticuerpo anti-CD40 antagonista inhiba esta proliferación. Se probó la capacidad de los dos anticuerpos anti CD40 candidatos en concentraciones variables (0,01 µg/ml hasta 100 µg/ml) para inhibir la proliferación inducida por ligandos de CD40 de células de NHL de los pacientes. Se cultivaron las células de NHL de los pacientes en suspensión sobre un alimentador de expresión de CD40L en presencia de IL-4. La proliferación de las células de NHL se midió por la incorporación de ³H-timidina. Se encontró que ambos anticuerpos son muy eficaces para inhibir la proliferación de células de NHL inducida por ligandos de CD40 (Tabla 12, n = 2). Pudo alcanzarse la inhibición prácticamente completa de la proliferación inducida por ligandos de CD40 con concentraciones de anticuerpos de 1,0 a 10 µg/ml.

ES 2 333 971 T3

TABLA 12

Inhibición de la proliferación inducida por ligando de CD40 de células cancerosas de los GL de pacientes con NHL

Paciente	Conc. Ab (µg/ml)	CPM	CHIR-5.9		CHIR-12.12		Rituximab	
		IgG1	CPM	% de inhibición	CPM	% de inhibición	CPM	% de inhibición
BD	0,01	29525,5	25369	14	24793	16	29490,3	0
	0,1	29554	20265,33	31	13671	54	29832,7	-1
	1	29486,67	6785,33	77	453	98	26355,3	11
	10	29710	506,33	98	371	99	29427,3	1
	100	29372,33	512,33	98	386,67	99	ND	ND
PP	0,01	23572	23229,33	1	23666	0	25317,3	-7
	0,1	22520	19092,33	15	17197	24	26349,7	-17
	1	23535,67	1442,33	94	802,67	97	26515,7	-13
	10	23101,5	608,67	97	221,33	99	25478,3	-10
	100	23847,33	ND	ND	252	99	ND	ND

% de inhibición: 100 – (CPM con Ab de prueba / CPM con mAb control) * 100%

Ejemplo 12

Efecto de CHIR-5.9 sobre el número de células de NHL viables cuando se cultivan con células que llevan ligando de CD40

Se investigaron los efectos de CHIR-5.9 sobre el número de células de NHL viables cuando se cultivan con células que llegan ligando de CD40 durante un período de tiempo prolongado (días 7, 10 y 14). La señal mediada por el ligando de CD40 a través de CD40 es importante para la supervivencia de las células B. Esta serie de experimentos evaluó el efecto de los anticuerpos anti CD40 sobre el número de células de NHL en los días 7, 10 y 14. Se cultivaron células de NHL de cinco pacientes en suspensión sobre un soporte de células alimentadoras con expresión de CD40L irradiado en presencia de IL-4. Los anticuerpos IgG humano de control y CHIR-5.9 se añadieron en concentraciones de 10 µg/ml en el día 0 y en el día 7. Se contaron las células viables bajo cada condición en el día especificado. Los números de células aumentaron en el grupo de control (IgG) con el tiempo como se esperaba. Se recuperaron números de células reducidos de los cultivos tratados con CHIR-5.9 comparado con el grupo de control. El mayor nivel de reducción en el número de células por el anticuerpo CHIR-5.9 se observó en el día 14 y fue en promedio de 80,5% (un intervalo de 49-94%) comparado con el control de isotipo (n = 5). Estos datos se resumen en la Tabla 13.

TABLA 13

Efecto del anticuerpo anti CD40 (CHIR-5.9/5.11) en los números de células de pacientes con NHL durante períodos de cultivo prolongados (día 7, 10 y 14)

Paciente	Días en cultivo	Número de células viables		% de reducción comparado con IgG de control
		IgG	mAb CHIR-5.9/5.11	
PS	0	100000	1000000	0,00
	7	935000	447500	52,14
	10	127090	504100	6034
	14	102910	525000	48,98
			100000	

ES 2 333 971 T3

Paciente	Días en cultivo	Número de células viables		% de reducción comparado con IgG de control
		IgG	mAb CHIR-5.9/5.11	
MT	0	0	1000000	0,00
	7	267600	182500	31,80
	10	683400	191600	71,96
	14	145000	225000	84,48
BRF	0	250000	250000	0,00
	7	145000	86667	40,23
	10	207500	65000	68,67
	14	570500	33330	94,16
DP	0	250000	250000	0,00
	7	188330	136670	27,43
	10	235000	128330	45,39
	14	428330	58330	86,38
PP	0	250000	250000	0,00
	7	270000	176670	34,57
	10	311670	128330	58,83
	14	458330	53330	88,36
*% de reducción comparado con Ab control = 100 – (Ab de prueba/Ab control) * 100				

5
10
15
20
25
30
35

40 Ejemplo 13

45 *CHIR-5.9 y CHIR-12.12 son capaces de causar citolisis de células cancerosas de ganglios linfáticos de pacientes con NHL por ADCC*

50 Tanto CHIR-5.9 como CHIR-12.12 son anticuerpos de tipo IgG1 totalmente humanos y se ha mostrado que inducen la citolisis de líneas celulares de linfoma *in vitro* por el mecanismo de ADCC (Tabla 9). Se probó su capacidad para causar citolisis de células cancerosas de un único paciente con NHL en ensayos *in vitro*. En este ensayo se usaron como células efectoras células NK enriquecidas de un donador voluntario normal recién extraídas tras el aislamiento o tras cultivar durante la noche a 37°C. Se obtuvieron resultados similares con las células NK recién aisladas y con las células NK usadas tras cultivar durante la noche. El nivel más alto de ADCC se observó con CHIR-12.12 comparado con CHIR-5.9 frente a las células de NHL del paciente. Las células de NHL también expresan CD20, el antígeno diana para rituximab (Rituxan®), que hizo posible la comparación de la actividad ADCC de estos dos mAb candidatos con rituximab. El anticuerpo CHIR-12.12 y rituximab muestran un nivel de actividad ADCC similar con una puntuación inferior para CHIR-5.9 en este ensayo. Estos datos se muestran en las Figuras 3A y 3B.

60 Ejemplo 14

65 *CHIR-5.9 y CHIR-12.12 pueden bloquear la supervivencia y la proliferación mediadas por CD40 de células cancerosas de pacientes con CLL*

Los anticuerpos candidatos pueden bloquear la supervivencia y la proliferación mediadas por CD40 de células cancerosas de pacientes con CLL. Se cultivaron células de CLL de pacientes en suspensión sobre células CHO que expresan CD40L fijadas con formaldehído bajo dos condiciones diferentes: adición de anticuerpo IgG de isotipo humano (control); y adición de anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12. Todos los anticuerpos se añadieron en concentraciones de 1, 10 y 100 µg/ml en ausencia de IL-4. Los recuentos de células se realizaron a las 24 y 48 horas por medio de ensayo MTS. Se recuperaron números de células reducidos de los cultivos tratados con CHIR-5.9

ES 2 333 971 T3

(n = 6) y CHIR-12.12 (n = 2) comparados con el grupo de control. Las mayores diferencias en los números de células entre los cultivos tratados con mAb anti CD40 y tratados con anticuerpo de control se observaron en el punto temporal de 48 horas. Estos datos se resumen en la Tabla 14.

5

TABLA 14

El efecto de los anticuerpos candidatos en la supervivencia y la proliferación inducidas por CD40 de células cancerosas de pacientes con CLL medido a las 48 horas tras iniciar el cultivo

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Paciente N°	Conc. Ab (µg/ml)	Número relativo de células			% de reducción en el número de células *		
		IgG1	CHIR-5.9/5.11	CHIR-12.12	CHIR 5.9-5.11	CHIR- 12.12	
1	1	269,3	1	25,27	ND	90,62	ND
	10	101,5	8	33,07	ND	67,44	ND
	100	130,7	1	40,16	ND	69,28	ND
2	1	265,5	5	75,8	ND	71,46	ND
	10	227,5	7	128,5	ND	43,53	ND
	100	265,9	9	6,4	ND	97,59	ND
3	1	85,9	35,39	ND	58,80	ND	ND
	10	70,44	39,51	ND	43,91	ND	ND
	100	77,65	20,95	ND	73,02	ND	ND
4	1	80,48	15,03	ND	81,32	ND	ND
	10	63,01	19,51	ND	69,04	ND	ND
	100	55,69	3,65	ND	93,45	ND	ND
5	1	90,63	91,66	89,59	-1,14	1,15	
	10	78,13	82,28	60,41	-5,31	22,68	
	100	63,53	86,47	39,59	-36,11	37,68	
6	1	1	77,6	71,88	40,40	44,80	
	10	131,7	7	78,13	73,96	40,71	43,87
	100	127,0	8	76,56	82,29	39,75	35,25

* % de reducción comparado con Ab de control = 100 – (Ab de prueba/Ab de control) * 100

Ejemplo 15

*CHIR-5.9 y CHIR-12.12 muestran actividad antitumoral en modelos animales*5 *Farmacología/eficacia in vivo*

Se espera que los mAb candidatos produzcan los efectos farmacológicos deseados para reducir la carga tumoral por cualquiera de dos mecanismos antitumorales, bloqueo de la señal de proliferación/supervivencia e inducción de ADCC. Los modelos de xenoinjerto de linfoma humano disponibles en la actualidad usan líneas celulares de linfoma de largo plazo que, a diferencia de las células cancerosas primarias, no son dependientes de la estimulación de CD40 para su crecimiento y supervivencia. Por consiguiente, se espera que el componente de esta actividad antitumoral de estos mAb basado en el bloqueo de la señal de proliferación/supervivencia tumoral no contribuya a la eficacia antitumoral en estos modelos. La eficacia en estos modelos es dependiente de la ADCC, el segundo mecanismo antitumoral asociado con los mAb CHIR-5.9 y CHIR-12.12. Se evaluaron las actividades antitumorales de los mAb candidatos con dos modelos de xenoinjerto de linfoma humano en líneas celulares Namalwa y Daudi. Para demostrar más su actividad terapéutica, se evaluaron estos mAb en un modelo de xenoinjerto no estadificado y xenoinjerto estadificado de linfoma humano basados en la línea celular Daudi.

20 *Resumen de los datos de eficacia in vivo*

Cuando se administró por vía intraperitoneal (i.p.) una vez a la semana durante un total de 3 dosis, CHIR-12.12, uno de los dos mAb candidatos, inhibió significativamente el crecimiento del linfoma de células B agresivo no estadificado (Namalwa) en una manera dependiente de la dosis (Figura 4). El segundo mAb candidato, CHIR-5.9, se probó sólo en una dosis única en este estudio y fue menos eficaz que CHIR-12.12 en la misma dosis. De manera interesante, se encontró que CHIR-12.12 fue más eficaz en este modelo que rituximab. Es posible que la eficacia inferior por medio de rituximab pudiera deberse a la baja expresión de CD20 en la línea celular de linfoma Namalwa. La eficacia observada con los mAb candidatos tiene mayor importancia porque sólo uno de los dos mecanismos de citólisis de células cancerosas (ADCC) es operativo en el actual modelo de xenoinjerto de linfoma. Se espera que dos mecanismos de citólisis, ADCC y bloqueo de la señal de supervivencia, contribuyan a las actividades antitumorales en los pacientes humanos con linfoma. Esto probablemente aumente la posibilidad de alcanzar eficacia en los pacientes humanos con linfoma. Los mAb anti CD40 candidatos también mostraron una tendencia hacia la inhibición del crecimiento tumoral en un segundo modelo de linfoma de células B (modelo de Daudi no validado, datos no mostrados). En estudios de seguimiento, se mostró que los dos anticuerpos candidatos tenían eficacia antitumoral dependiente de la dosis, tanto en el modelo de linfoma Daudi no estadificado como en el estadificado (Figuras 5 y 6, respectivamente). En el modelo de Daudi estadificado, el mAb CHIR-12.12 fue más eficaz para reducir el volumen tumoral que una dosis similar de Rituxan®.

40 *Modelos de xenoinjerto de linfoma de células B humano*

Para asegurar el crecimiento constante del tumor, se irradió el cuerpo entero de ratones desnudos deficientes en células T a 3 Gy para suprimir además el sistema inmune un día antes de la inoculación del tumor. Las células tumorales se inocularon por vía subcutánea en el costado derecho a razón de 5×10^6 células por ratón. El tratamiento se inició un día después de la implantación del tumor (modelos de xenoinjerto de linfoma de células B humano subcutáneo no estadificado, Namalwa y Daudi) o cuando el volumen del tumor alcanzó 200-400 mm³ (modelo de estadificado Daudi, usualmente 15 días después de la inoculación del tumor). Se inyectaron los ratones que llevaban el tumor con los mAb anti CD40 por vía intraperitoneal (i.p.) una vez a la semana en las dosis indicadas. Se registraron los volúmenes tumorales dos veces por semana. Cuando el volumen del tumor en cualquier grupo alcanzó 2500 mm³, el estudio se dio por terminado. Nótese que en el modelo estadificado de Daudi, los datos de volumen tumoral se analizaron hasta el día 36 por la muerte de algunos ratones después de ese día. La regresión completa (CR) se contó hasta el final del estudio. Los datos se analizaron usando ANOVA o prueba de Kruskal-Wallis y la correspondiente prueba posterior para la comparación de grupos múltiples.

En el modelo no estadificado de Namalwa, el mAb anti CD40 CHIR-12.12, pero no Rituxan® (rituximab), aumentó significativamente ($p < 0,01$) el crecimiento de los tumores de Namalwa (reducción del volumen tumoral del 60% frente al 25% para rituximab, $n = 10$ ratones/grupo) (Figura 4). Por consiguiente, en este modelo, el mAb anti CD40 CHIR-12.12 fue más potente que rituximab. Cabe destacar que el segundo mAb candidato, CHIR-5.9, fue al menos tan eficaz como rituximab en una dosis de 1/10 de la de rituximab. Ambos mAb anti CD40, CHIR-12.12 y rituxan previnieron significativamente el desarrollo tumoral en el modelo de tumor no estadificado de Daudi (14/15 resistencia al desafío tumoral) (Figura 5).

Cuando estos anticuerpos monoclonales anti CD40 se compararon además en un modelo de xenoinjerto estadificado de Daudi, en el que el tratamiento comentó cuando el tumor subcutáneo era palpable, el mAb anti CD40 CHIR12.12 en una dosis de 1 mg/kg causó reducción significativa del tumor ($p=0,003$) con regresión completa del 60% (6/10), mientras que rituximab en la misma dosis no inhibió significativamente el crecimiento tumoral ni causó regresión completa (0/10). Véase Figura 6.

ES 2 333 971 T3

En resumen, el mAb anti CD40 CHIR-12.12 inhibió significativamente el crecimiento tumoral en modelos experimentales de linfoma. En la misma dosis y el mismo régimen, el mAb CHIR-12.12 mostró mejor actividad anticancerosa que Rituxan® (rituximab). Además, no se observaron signos de toxicidad en esta dosis y en este régimen. Estos datos sugieren que el mAb anti CD40 CHIR-12.12 tiene potente actividad anti linfoma humano *in vitro* y en modelos de xenoinjerto y podría ser clínicamente eficaz para el tratamiento del linfoma.

Ejemplo 16

10 Farmacocinética de CHIR-5.9 y CHIR-12.12

La farmacocinética de mAb anti CD40 en ratones se estudió tras una administración única IV e IP. El mAb anti CD40 exhibió alta biodisponibilidad sistémica tras la administración IP, y semivida terminal prolongada (> 5 días) (datos no mostrados). Este estudio piloto se realizó para ayudar en el diseño de estudios de farmacología; sin embargo, tiene poca o ninguna importancia para la actividad de desarrollo de este mAb ya que este mAb totalmente humano no reacciona de manera cruzada con CD40 de ratón.

Ejemplo 17

20 Caracterización del epítipo para los anticuerpos monoclonales CHIR-12.12 y CHIR-5.9

Para determinar la localización del epítipo en CD40 reconocido por los anticuerpos monoclonales CHIR-12.12 y CHIR-5.9, se realizaron análisis SDS-PAGE y transferencia Western. Se separó CD40 purificado (0,5 µg) en un gel NUPAGE al 4-12% bajo condiciones reductoras y no reductoras, se transfirió a membranas PVDF, y se realizó el sondeo con anticuerpos monoclonales en una concentración de 10 µg/ml. Las transferencias se sondearon con IgG anti humano conjugada con fosfatasa alcalina y se desarrolló usando el sustrato estabilizado Azul Western® para fosfatasa alcalina (Promega).

Los resultados indican que el anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR12.12 reconoce epítipos tanto en la forma no reducida como en la forma reducida de CD40, exhibiendo la forma no reducida de CD40 mayor intensidad que la forma reducida de CD40 (Tabla 15; transferencias no mostradas). El hecho de que el reconocimiento fuera positivo para ambas formas de CD40 indica que este anticuerpo interactúa con un epítipo conformacional, parte del cual es una secuencia lineal. El anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 reconoce principalmente la forma no reducida de CD40 sugiriendo que este anticuerpo interactúa principalmente con un epítipo conformacional (Tabla 15; transferencias no mostradas).

40 TABLA 15

Identificación de dominios

	Dominio 1	Dominio 2	Dominio 3	Dominio 4
45 mAb CHIR-12.12	-	+	-	-
mAb CHIR-5.9	-	+	-	-
50 mAb 15B8	+	-	-	-

Para realizar un mapa de la región antigénica en CD40, se clonaron los cuatro dominios extracelulares de CD40 y se expresaron en células de insecto como proteínas de fusión GST. La secreción de los cuatro dominios se aseguró con una señal de secreción GP67. El sobrenadante de las células de insecto se analizó por análisis SDS-PAGE y transferencia Western para identificar el dominio que contenía el epítipo.

EL anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 reconoce un epítipo en el Dominio 2 tanto bajo condiciones reductoras como no reductoras (Tabla 16; transferencias no mostradas). Por el contrario, el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 exhibe reconocimiento muy débil para el Dominio 2 (Tabla 16; transferencias no mostradas). Ninguno de estos anticuerpos reconoce los Dominios 1, 3 ó 4 en este análisis.

65

ES 2 333 971 T3

TABLA 16

Análisis del Dominio2

	Reducido	No reducido
mAb CHIR-12.12	++	+++
mAb CHIR-5.9	+	+

Para definir con más precisión el epítipo reconocido por el mAb CHIR-12.12, se sintetizaron péptidos del Dominio 2 extracelular de CD40, que corresponde a la secuencia PCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQKGTSETDTICT (residuos 61-104 de la secuencia mostrada en SEC ID N° 10 o SEC ID N° 12). Se generaron membranas de síntesis SPOTs (Sigma) conteniendo treinta y cinco péptidos 10-meros con un desplazamiento de 1 aminoácido. Se realizó el análisis de transferencia Western con mAb CHIR-12.12 y anti IgG humana marcado con beta galactosidasa como anticuerpo secundario. Se desmontó la transferencia y se volvió a sondear con mAb CHIR-5.9 para determinar la región reconocida por este anticuerpo.

Los análisis SPOTs sondando con anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR-12.12 en una concentración de 10 µg/ml dieron reacciones positivas con las transferencias 18 a 22. La región de la secuencia cubierta por estos péptidos se muestra en la Tabla 17.

TABLA 17

Resultados de análisis SPOTs con sondeo con anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR-12.12

Número de transferencia	Región de la secuencia
18	HQHKYCDPNL (residuos 78-87 de SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 12)
19	QHKYCDPNLG (residuos 79-88 de SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 12)
20	HKYCDPNLGL (residuos 80-89 de SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 12)
21	KYCDPNLGLR (residuos 81-90 de SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 12)
22	YCDPNLGLRV (residuos 82-91 de SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 12)

Estos resultados corresponden a un epítipo lineal de: YCDPNL (residuos 82-87 de la secuencia mostrada en SEC ID N°:10 o SEC ID N° 12). Este epítipo contiene Y82, D84 y N86, que se ha predicho que están implicados en la interacción CD40-ligando de CD40.

Los análisis SPOTs con mAb CHIR-5.9 mostraron un débil reconocimiento de los péptidos representados por las transferencias 20-22 mostradas en la Tabla 18, sugiriendo implicación de la región YCDPNLGL (residuos 82-89 de la secuencia mostrada en SEC ID N° 10 o SEC ID N° 12) en su unión a CD40. Debe señalarse que los mAb CHIR-12.12 y CHR-5.9 compiten uno con el otro por la unión a CD40 en el análisis BIACORE.

TABLA 18

Resultados de análisis SPOTs con sondeo con anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR-5.9

Número de transferencia	Región de la secuencia
20	HKYCDPNLGL (residuos 80-89 de SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 12)
21	KYCDPNLGLR (residuos 81-90 de SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 12)
22	YCDPNLGLRV (residuos 82-91 de SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 12)

ES 2 333 971 T3

Los epítomos lineales identificados por los análisis SPOTs están dentro del módulo B1 de CD40. La secuencia del módulo B1 de CD40 es:

5 HKYCDPNLGLRVQKGTSETDTIC (residuos 80-103 de SEC ID N° 10 o SEC ID N° 12).

Dentro del epítopo lineal identificado para CHIR-12.12 está C83. Se sabe que este residuo de cisteína forma un enlace disulfuro con C103. Es probable que el epítopo conformacional del mAb CHIR-12.12 contenga este enlace disulfuro (C83-C103) y/o aminoácidos vecinos conformacionalmente próximos a C103.

Ejemplo 18

15 *Número de moléculas de CD20 y CD40 en células Namalwa y Daudi*

El número de moléculas de CD20 y CD40 en células Namalwa y Daudi se determinó como se resume en la Figura 7, usando concentraciones de anticuerpos de 0,01, 0,1, 1, 10 y 100 µg/ml. Como puede verse en la Figura 7, el número promedio de moléculas de CD20 (diana para rituximab) es más elevado en ambas líneas celulares, Namalwa y Daudi, que el número de moléculas de CD40 (diana para mAb CHIR-12.12).

Ejemplo 19

25 *ADCC del mAb CHIR-12.12 y rituximab contra las células de linfoma de Daudi*

Se probó la actividad de ADCC del rituximab y del mAb candidato CHIR-12.12 *in vitro* en concentraciones variables contra la línea celular de linfoma de Daudi como células diana (D) y células NK purificadas de voluntarios humanos sanos como células efectoras (E). Se mezclaron células NK humanas aisladas con células de linfoma de Daudi marcadas con calceína en una relación E:D de 10. Se incubó la mezcla de células durante 4 horas a 37°C en presencia de las concentraciones indicadas de mAb CHIR-12.12 o rituximab. El nivel de calceína liberado de las células diana lisadas en el sobrenadante se midió como Unidades Fluorescentes Arbitrarias (AFU). Se calculó el porcentaje de lisis específica como: $100 \times (\text{AFU prueba} - \text{AFU liberación espontánea}) / (\text{AFU liberación máxima} - \text{AFU liberación espontánea})$, donde la AFU liberación espontánea es la calceína liberada por las células diana en ausencia de anticuerpo o células NK, y AFU liberación máxima es la calceína liberada por las células diana tras la lisis por detergente.

Se observó lisis de células Daudi dependiente de la concentración de anticuerpo (Figura 8; Tabla 19 a continuación). La lisis específica máxima de células diana de linfoma inducida por mAb anti CD40 fue mayor comparada con la lisis inducida por rituximab (63,6% frente a 45,9%, n = 6; prueba t pareada de mAb CHIR-12.12 frente a rituximab, p = 0,0002). Además, la DE50 para rituximab fue en promedio (n = 6) 51,6 pM, 13 veces más alta que la DE50 para el mAb anti CD40 CHIR 12.12 para esta actividad.

TABLA 19

ADCC comparativa del mAb CHIR-12.12 y rituximab contra células de linfoma de Daudi

Donador de células	Citolisis máxima (%)		DE50 (pM)	
	mAb CHIR-12.12	Rituximab	mAb CHIR-12.12	Rituximab
1	50,2	34,9	3,2	14,2
2	83,1	68,6	2,2	27,2
3	64,2	36,9	4,1	66,9
4	53,3	39,5	2,4	47,6
5	74,8	56,6	2,8	24,1
6	56,2	38,9	7,9	129,5
Promedio	63,6	45,9	3,8	51,6

Ejemplo 20

CHIR-12.12 bloquea las vías de supervivencia y de señal de CD40 mediadas por CD40L en células B humanas normales

5 El ligando de CD40 soluble (CD40L) activa las células B e induce diversos aspectos de respuestas funcionales, incluidos el aumento de la supervivencia y la proliferación, y la activación de las vías de señales de NF κ B, ERK/MAPK, PI3K/Akt y p38. Además, la estimulación de CD40 mediada por CD40L proporciona señales de supervivencia por reducción de PARP escindido e inducción de proteínas antiapoptóticas, XIAP y Mcl-1, en células B normales. La estimulación de CD40 mediada por CD40L también recluta TRAF2 y TRAF3 para la unión al dominio citoplasmático de CD40.

15 Los siguientes estudios demuestran que CHIR-12.12 inhibió directamente todos estos efectos de la estimulación en las células B humanas normales. Por ejemplo, el tratamiento con CHIR-12.12 dio como resultado el aumento de escisión de caspasa-9, caspasa-3 y PARP así como la reducción de XIAP y Mcl-1 de una manera dependiente del tiempo y de la dosis, restaurando la apoptosis de las células B. El tratamiento con CHIR-12.12 también inhibió la fosforilación de I κ B cinasa (IKK) α y β (vía de NF κ B), ERK, Akt y p38 en respuesta a la estimulación de CD40 mediada por CD40L. Además, se encontró que CHIR-12.12 no provocó estos efectos apoptóticos sin la estimulación inicial de CD40 mediada por CD40L.

20 *CHIR-12.12 inhibió la supervivencia mediada por ligando de CD40 al inducir la escisión de PARP*

25 En estos experimentos, se estimularon $0,6 \times 10^6$ células B humanas normales de donadores sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95%) con sCD40L $1 \mu\text{g/ml}$ (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, RU). A continuación se añadió CHIR-12.12 ($10 \mu\text{g/ml}$) e IgG de control. Las células se recogieron a los 0 y 20 minutos, a las 2 horas, 6 horas, 18 horas y 26 horas. Se detectaron controles de caspasa 9 escindida, caspasa 3 escindida, PARP escindida y β actina en los lisados celulares por transferencia Western.

30 En resumen, se observó que la estimulación de CD40 mediada por CD40L proporcionó señales de supervivencia ya que no dio lugar a aumentos de caspasa 9 escindida, caspasa 3 escindida o PARP escindida con el tiempo, indicando que las células no estaban sufriendo apoptosis. Sin embargo, el tratamiento con CHIR-12.12 dio como resultado un aumento de estos productos de escisión, indicando que el tratamiento con CHIR-12.12 anuló los efectos de la unión de CD40L en las señales de supervivencia en las células B normales estimuladas con cCD40L, restaurando la apoptosis de las células B (datos no mostrados).

35 *CHIR-12.12 inhibió la expresión de proteínas antiapoptóticas de "supervivencia"*

40 En estos experimentos, se estimularon $0,6 \times 10^6$ células B humanas normales de donadores sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95%) con sCD40L $1 \mu\text{g/ml}$ (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, RU). A continuación se añadió CHIR-12.12 ($10 \mu\text{g/ml}$) e IgG de control. Las células se recogieron a los 0 y 20 minutos, a las 2 horas, 6 horas, 18 horas y 26 horas. Se detectaron controles de Mcl-1, XIAP, CD40 y β actina en los lisados celulares por transferencia Western.

45 En resumen, la estimulación con sCD40L dio como resultado la expresión sostenida de Mcl-1 y XIAP con el tiempo. Sin embargo, el tratamiento de las células estimuladas con sCD40L con CHIR-12.12 dio como resultado una disminución en la expresión de estas proteínas con el tiempo (datos no mostrados). Como Mcl-1 y XIAP son señales de "supervivencia" capaces de bloquear la vía apoptótica, estos resultados demuestran que el tratamiento con CHIR-12.12 elimina el bloqueo contra la apoptosis en las células B normales estimuladas con sCD40L.

50 *El tratamiento con CHIR-12.12 inhibió la fosforilación de IKK α (Ser180) e IKK β (Ser 181) en células B normales*

55 En estos experimentos, se estimularon $1,0 \times 10^6$ células B humanas normales de donadores sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95%) con sCD40L $1 \mu\text{g/ml}$ (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, RU). A continuación se añadió CHIR-12.12 ($10 \mu\text{g/ml}$) e IgG de control. Las células se recogieron a los 0 y 20 minutos. Se detectaron los controles de IKK α (Ser180) e IKK β (Ser 181) y de IKK β total en los lisados celulares por transferencia Western.

60 En resumen, la estimulación por medio de sCD40L dio como resultado la fosforilación de IKK α (Ser180) e IKK β (Ser 181) con el tiempo; sin embargo, el tratamiento con CHIR-12.12 anuló esta respuesta a la estimulación de sCD40L en las células B normales (datos no mostrados).

65

ES 2 333 971 T3

El tratamiento con CHIR-12.12 inhibió la supervivencia mediada por ligando de CD40 de una manera dependiente de la dosis

5 En estos experimentos, se estimularon $0,6 \times 10^6$ células B humanas normales de donadores sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95%) con sCD40L $1 \mu\text{g/ml}$ (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, RU). A continuación se añadió CHIR-12.12 (0,01, 0,1, 0,2, 0,5, $1,0 \mu\text{g/ml}$) e IgG de control. Las células se recogieron a las 24 horas. Se detectaron los controles de PARP escindida y β actina en los lisados celulares por transferencia Western.

10 Brevemente, el tratamiento con CHIR-12.12 dio como resultado el aumento de escisión de PARP en células estimuladas con sCD40L de una manera dependiente de la dosis y, por consiguiente, anuló la vía de señales de supervivencia en las células B normales estimuladas con sCD40L (datos no mostrados).

15 *CHIR-12.12 inhibió la expresión de proteínas antiapoptóticas de "supervivencia" de una manera dependiente de la dosis*

20 En estos experimentos, se estimularon $0,6 \times 10^6$ células B humanas normales de donadores sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95%) con sCD40L $1 \mu\text{g/ml}$ (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, RU). A continuación se añadió CHIR-12.12 (0,5, 2 y $10 \mu\text{g/ml}$) e IgG de control. Las células se recogieron a las 22 horas. Se detectaron los controles de Mcl-1, XIAP, PARP escindida y β actina en los lisados celulares por transferencia Western.

25 Brevemente, el tratamiento con CHIR-12.12 redujo la expresión de Mcl-1 y XIAP y aumentó la expresión de PARP en células estimuladas con sCD40L de una manera dependiente de la dosis y, por consiguiente, anuló estos bloqueos a la vía apoptótica en las células B normales estimuladas con sCD40L (datos no mostrados).

CHIR-12.12 no afecta la expresión de proteínas antiapoptóticas, PARP escindida y XIAP, en ausencia de señales de CD40L soluble

30 En estos experimentos, se estimularon $1,0 \times 10^6$ células B humanas normales de donadores sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95%) con CHIR-12.12 ($10 \mu\text{g/ml}$) e IgG de control sola (es decir, las células no se estimularon previamente con sCD40L antes de añadir el anticuerpo). Las células se recogieron a las 0, 4, 14 y 16 horas. Se detectaron los controles de XIAP, PARP escindida y β actina en los lisados celulares por transferencia Western.

35 Brevemente, los resultados muestran que sin estimulación de sCD40L, las células expresaron concentraciones aumentadas de PARP escindida, mientras que la expresión de XIAP permaneció constante, tanto en las células tratadas con IgG de control como en las tratadas con CHIR-12.12 (datos no mostrados). Estos datos indican que CHIR-12.12 no provoca apoptosis en las células B humanas normales sin estimulación de CD40L.

40 *CHIR-12.12 inhibe la fosforilación de IKK α (Ser180) e IKK β (Ser181), Akt, ERK y p38 en las células B normales*

45 En estos experimentos, se privaron de suero en medio que contenía FBS al 1% $1,0 \times 10^6$ células B humanas normales de donadores sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95%) y se estimularon con sCD40L $1 \mu\text{g/ml}$ (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, RU). Los cultivos se trataron con CHIR-12.12 (1 y $10 \mu\text{g/ml}$) e IgG de control. Las células se recogieron a los 0 y 20 minutos. Se detectaron fosfo-IKK α , fosfo-IKK β , IKK β total, fosfoERK, ERK total, fosfo-Akt, Akt total, fosfo-p38 y p38 total en los lisados celulares por transferencia Western.

50 En resumen, la estimulación con sCD40L dio como resultado aumentos en la fosforilación de IKK α/β , fosforilación de ERK, fosforilación de Akt y fosforilación de p38, por consiguiente dando lugar a la supervivencia y/o proliferación de las células. El tratamiento de las células con CHIR-12.12 anuló los efectos de la estimulación de sCD40L en estas vías de señales en las células B normales (datos no mostrados).

55 *CHIR 12.12 inhibe las vías de señales tales como PI3K y MEK /ERK en la cascada de señales de CD40*

60 En estos experimentos, se privaron de suero en medio que contenía FBS al 1% $1,0 \times 10^6$ células B humanas normales de donadores sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95%) y se estimularon con sCD40L $1 \mu\text{g/ml}$ (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, RU). Los cultivos se trataron también con CHIR-12.12 (1 y $10 \mu\text{g/ml}$), Wortmanin (un inhibidor de PI3K/Akt, 1 y $10 \mu\text{M}$), LY 294002 (un inhibidor de PI3K/Akt; 10 y $30 \mu\text{M}$) y PD 98095 (un inhibidor de MEK, 10 y $30 \mu\text{g/ml}$). Las células se recogieron a los 0 y 20 minutos. Se detectaron fosfoERK, fosfo-Akt, Akt total, fosfo-IKK α/β y total en los lisados celulares por transferencia Western.

65 En resumen, los resultados muestran que CHIR-12.12 anuló la fosforilación de todas estas moléculas de transducción de señales, mientras que los inhibidores de transducción de señales mostraron sólo anulación específica de las señales, indicando que CHIR-12.12 probablemente inhibe en una etapa anterior a estas moléculas de transducción de señales mediadas por la estimulación por CD40L (datos no mostrados).

ES 2 333 971 T3

CHIR-12.12 inhibe la unión de las moléculas de señal TRAF2 y TRAF3 al dominio citoplásmico de CD40 en las células B normales

En estos experimentos, se privaron de suero durante cuatro horas en medio que contenía FBS al 1% 4,0 x 10⁶ células B humanas normales de donadores sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95%) y se estimularon con sCD40L 1 µg/ml (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, RU) durante 20 minutos. Las células se recogieron a los 0 y 20 minutos. Se inmunoprecipitó CD40 usando anti CD40 policlonal (Santa Cruz Biotechnology, CA), y se sondeó en una transferencia Western con mAb anti TRAF2 (Santa Cruz Biotechnology, CA), mAb anti TRAF3 (Santa Cruz Biotechnology, CA), y mAb anti CD40 (Santa Cruz Biotechnology, CA).

En resumen, los resultados muestran que TRAF2 y TRAF3 precipitaron conjuntamente con CD40 tras la estimulación de sCD40L. Por el contrario, el tratamiento con CHIR-12.12 anuló la formación del complejo de señal CD40-TRAF2/3 en células B normales estimuladas con sCD40L. No hubo cambios en la expresión de CD40 (datos no mostrados).

Sin estar ligados por la teoría, los resultados de estos experimentos, y los resultados en los ejemplos resumidos anteriormente, indican que el anticuerpo CHIR-12.12 es un anticuerpo monoclonal anti CD40 antagonista de acción dual que tiene una única combinación de atributos. Este anticuerpo monoclonal totalmente humano bloquea las vías de señales de CD40 mediadas por CD40L para la supervivencia y la proliferación de las células B; este antagonismo da lugar finalmente a la muerte celular. CHIR-12.12 también media el reconocimiento y la unión por las células efectoras, iniciando la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Una vez que CHIR-12.12 está unido a las células efectoras, se liberan las enzimas citolíticas, dando lugar a la apoptosis y lisis de las células B. CHIR-12.12 es un anticuerpo antitumoral más potente que rituximab cuando se compara en modelos de tumores preclínicos.

Ejemplo 21

Actividad agonista y antagonista contra células primarias de cáncer de pacientes con NHL, CLL y MM

En colaboración con investigadores clínicos, el mAb candidato se prueba para una diversidad de actividades (presentadas a continuación) contra las células primarias de cáncer de pacientes con NHL, CLL y mieloma múltiple.

- Efecto agonista en ensayos de proliferación (8 pacientes con NHL, 8 pacientes con CLL y 8 pacientes con MM).

- Efecto antagonista en ensayos de proliferación (8 pacientes con NHL, 8 pacientes con CLL y 8 pacientes con MM).

- Efecto apoptótico por el ensayo de Anexina V (3-4 pacientes con NHL, 4 pacientes con CLL y 4 pacientes con MM).

- Señal de reversión de supervivencia por el ensayo de Anexina V (3 pacientes con NHL, 3 pacientes con CLL y 3 pacientes con MM).

- Citotoxicidad dependiente del complemento (4 pacientes con NHL, 4 pacientes con CLL y 4 pacientes con MM).

- Citotoxicidad dependiente de anticuerpos (6 pacientes con NHL, 6 pacientes con CLL y 6 pacientes con MM).

Ejemplo 22

Identificación de especies animales importantes para estudios de toxicidad

Como estos dos anticuerpos candidatos no reaccionan de manera cruzada con CD40 de roedores, deben identificarse otras especies para probar los efectos toxicológicos.

La capacidad de los dos anticuerpos anti CD40 candidatos para reaccionar de manera cruzada con CD40 de animales se prueba por ensayos de citometría de flujo. Para este estudio se prueban rata, conejo, perro, monos *Cynomolgus* y monos *Tití*.

Los anticuerpos candidatos muestran actividad antagonista tras la unión a CD40 en células B humanas. Para identificar una especie animal que tiene respuesta similar a los anticuerpos candidatos, se prueban linfocitos de especies que muestran unión a los anticuerpos candidatos en ensayos de proliferación para actividad antagonista. Los linfocitos de las especies seleccionadas para unión antagonista de anticuerpos candidatos se prueban además para analizar su capacidad para servir como células efectoras para causar citolisis de líneas celulares de linfoma que expresan CD40 a través del mecanismo de ADCC. Finalmente, las especies animales seleccionadas se prueban en un estudio de IHC para analizar el patrón de unión de los anticuerpos candidatos a los tejidos. Las especies animales que responden a los anticuerpos candidatos en estos ensayos de manera similar a la observada para células humanas se eligen para los estudios de toxicología.

ES 2 333 971 T3

Los estudios iniciales indican que los mAb anti CD40 candidatos reaccionan de manera cruzada con CD40 de mono Cynomolgus.

5 Ejemplo 23

Perfil de dianas tumorales de CHIR-5.9 y CHIR-12.12

Para determinar el perfil de dianas tumorales relativo de los mAb CHIR-12.12 y CHIR-5.9, se administran mAb
10 candidatos marcados fluorescentes y anticuerpos de control de isotipo en ratones que albergan tumores. Se recogen muestras de tumores y de órganos normales en diferentes puntos temporales tras la dosificación. Se analiza la acumulación de anticuerpos marcados en los tumores y en los órganos normales.

15 Ejemplo 24

Mecanismo de acción de CHIR-5.9 y CHIR-12.12

Para aclarar el(los) mecanismo(s) que media(n) la inhibición del crecimiento tumoral por los mAb CHIR-5.9 y
20 CHIR-12.12, se realizan los siguientes estudios:

Modelo knock out o de bloqueo de receptores de Fc: La ADCC está mediada por la unión de las células efectoras
tales como células NK, macrófagos y monocitos a la parte Fc del anticuerpo a través del receptor de Fc. Los ratones
con deficiencias en la activación de los receptores de Fc así como los anticuerpos diseñados para interrumpir la unión
25 del Fc a los receptores bloquearán la inhibición del crecimiento tumoral mediada por ADCC. La pérdida de inhibición tumoral o la inhibición tumoral significativamente reducida en este modelo sugerirán que la inhibición del crecimiento tumoral por estos mAb candidatos está mediada principalmente por el mecanismo de ADCC.

30 Ejemplo 25

*Formulación farmacéutica líquida para *anticuerpos anti CD40 antagonistas*

El objetivo de este estudio fue investigar los efectos del pH de la disolución en la estabilidad del anticuerpo anti
35 CD40 antagonista CHIR-12.12 por medio de procedimientos biofísicos y bioquímicos para seleccionar el entorno de disolución óptimo para este anticuerpo. Los resultados de calorimetría diferencial de barrido (DSC) mostraron que la estabilidad de la conformación de CHIR-12.12 es óptima en formulaciones que tienen pH 5,5-6,5. Basado en una combinación de análisis SDS-PAGE, HPLC de exclusión por tamaño (SEC-HPLC) y HPLC de intercambio catiónico (CEX-HPLC), la estabilidad fisicoquímica de CHIR-12.12 es óptima a un pH de aproximadamente 5,0-
40 5,5. En vista de estos resultados, una formulación farmacéutica líquida recomendada que comprende este anticuerpo es una formulación que comprende CHIR-12.12 en una concentración de aproximadamente 20 mg/ml formulada en succinato de sodio aproximadamente 10 mM, cloruro de sodio aproximadamente 150 mM y que tiene un pH de aproximadamente pH 5,5.

45

Materiales y procedimientos

El anticuerpo CHIR-12.12 utilizado en los estudios de formulación es un anticuerpo monoclonal humano producido
por un proceso de cultivo de células CHO. Este mAb tiene un peso molecular de 150 kDa y está constituido por dos
50 cadenas ligeras y dos cadenas pesadas unidas juntas por enlaces disulfuro. Está dirigido contra el receptor de CD40 de superficie celular en las células que expresan CD40, incluidas las células B normales y malignas, para el tratamiento de diversos tipos de cáncer y enfermedades autoinmunes/inflamatorias.

La sustancia del fármaco anti CD40 utilizada para este estudio fue un lote a granel de anti CD40 (CHIR-12.12)
55 purificado obtenido de células CHO. La composición de la sustancia del fármaco era de anticuerpo CHIR-12.12 9,7 mg/ml en citrato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, a pH 6,5. La muestra de control en el estudio era la sustancia del fármaco recibida, seguida por congelación a $\leq -60^{\circ}\text{C}$, descongelación a TA y probada junto con muestras de estabilidad en los puntos temporales predeterminados. Las muestras de estabilidad se prepararon por diálisis de la sustancia del fármaco contra disoluciones de diferentes pH y la concentración de CHIR-12.12 en cada una de las
60 muestras se determinó por UV 280 tal como se presenta en la Tabla 20.

65

ES 2 333 971 T3

TABLA 20

Formulaciones de CHIR-12.12

Composición tampón	pH	Concentración de CHIR-12.12 (mg/ml)
Citrato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM	4,5	9,0
Succinato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM	5,0	9,3
Succinato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM	5,5	9,2
Citrato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM	6,0	9,7
Citrato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM	6,5	9,4
Fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM	7,0	9,4
Fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM	7,5	9,5
Glicina 10 mM, cloruro de sodio 150 mM	9,0	9,5

La estabilidad fisicoquímica del anticuerpo CHIR-12.12 en las diversas formulaciones se ensayó usando los siguientes protocolos.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La estabilidad conformacional de diferentes muestras de formulaciones se controló usando un MicroCal VP-DSC tras calentar de 15°C hasta 90°C a razón de 1°C/min.

SDS-PAGE

Se estimó la fragmentación y la agregación usando gel Tris-glicina al 4-20% bajo condiciones no reductoras y reductoras. Se detectaron las proteínas por medio de tinción con azul Coomassie.

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC-HPLC)

La fragmentación y agregación de proteínas también se midió por medio de un sistema de HPLC Water Alliance con una columna Tosohaas TSK-GEL 3000SWXL, con fosfato de sodio 100 mM, pH 7,0 como fase móvil a un caudal de 0,7 ml/min.

Cromatografía de intercambio catiónico (CEX-H PLC)

La degradación relacionada con el cambio de cargas se midió usando un sistema de HPLC Waters 600s con una columna Dionex Propac WCX-10, con HEPES 50 mM, pH 7,3 como fase móvil A y HEPES 50 mM que contenía NaCl 500 mM, pH 7,3 como fase móvil B a un caudal de 0,5°C/min.

Resultados y discusión

Estudio de estabilidad conformacional

El desplegamiento térmico de CHIR-12.12 reveló al menos dos transiciones térmicas, que representan probablemente el desplegamiento y fusión de los dominios Fab y Fc, respectivamente. A temperaturas más altas, la proteína presumiblemente agregó, dando lugar a pérdida de la señal de DSC. Con la finalidad de seleccionar la formulación, se definió la temperatura de transición térmica más baja como la temperatura de fusión, Tf, en este estudio. La Figura 13 muestra la temperatura de fusión térmica como una función de los pH de las formulaciones. Las formulaciones a pH 5,5-6,5 proporcionaron anti CD40 con estabilidad conformacional superior como se demuestra por las temperaturas de fusión térmica más elevadas.

ES 2 333 971 T3

Análisis SDS-PAGE

Las muestras de formulaciones de CHIR-12.12 a pH 4,5-9,0 se incubaron a 40°C durante 2 meses y se sometieron al análisis SDS-PAGE (datos no mostrados). Bajo condiciones no reductoras, se observaron especies con peso molecular (PM) de 23 kDa y 2,7 kDa en formulaciones con pH superior a 5,5, y se observaron especies con PM de 51 kDa en todas las formulaciones, pero aparecieron menos a pH 5,0-5,5. Pudo verse una especie con PM de 100 kDa a pH 7,5 y pH 9,0.

Bajo condiciones reductoras, CHIR-12.12 se redujo en cadenas pesadas y cadenas ligeras libres con PM de 50 kDa y 24 kDa, respectivamente. Las especies de 100 kDa parecieron no ser totalmente reducibles y aumentaron con el aumento del pH de la disolución, sugiriendo que podría existir asociación covalente diferente de disulfuro en las moléculas. Como había otras especies con identidades desconocidas en SDS-PAGE, la comparación de estabilidad para cada formulación se basa en la pureza restante de CHIR-12.12. Las formulaciones a pH 5,0-6,0 proporcionaron un entorno más estable para CHIR-12.12. Se detectaron pocos agregados por medio de SDS-PAGE (datos no mostrados).

Análisis SEC-HPLC

El análisis SEC-HPLC detectó el CHIR-12.12 intacto como la especie del pico principal, una especie de agregación como una especie de pico anterior separada de la especie del pico principal, una especie de fragmento grande como un pico meseta en la parte posterior de la especie del pico principal, y se detectaron especies de fragmentos pequeños posteriores a las especies del pico principal. Tras la incubación a 5°C y 25°C durante 3 meses, se detectaron cantidades insignificantes de fragmentos y agregados de proteínas (<1,0%) en las formulaciones anteriores y las especies del pico principal de CHIR-12.12 siguieron teniendo más del 99% de pureza (datos no mostrados). Sin embargo, se desarrollaron gradualmente fragmentos tras el almacenamiento a 40°C y se formaron más fragmentos a pH 4,5 y pH 6,5-9,0, como se muestra en la Tabla 21. Tras incubar las formulaciones de CHIR-12.12 a 40°C durante 3 meses, se detectó aproximadamente 2-3% de agregados en pH 7,5 y pH 9,0, mientras que se detectó menos del 1% de agregados en las formulaciones a otros pH (datos no mostrados). Los resultados de SEC-HPLC indican que CHIR-12.12 es más estable a un pH de aproximadamente 5,0-6,0.

TABLA 21

Resultados de SEC-HPLC de muestras de estabilidad de CHIR-12.12 bajo condiciones de tiempo real y de almacenaje acelerado

Muestra	Pico principal %				Fragmentos %			
	t=0	40 °C 1 m	40 °C 2 m	40 °C 3 m	t=0	40 °C 1 m	40 °C 2 m	40 °C 3 m
Control	99,4	99,2	99,9	99,5	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
pH 4,5	99,4	93,2	86,0	81,3	<1,0	6,4	13,2	18,1
pH 5,0	99,8	98,7	91,3	89,2	<1,0	<1,0	7,8	10,2
pH 5,5	99,8	98,9	91,4	90,6	<1,0	<1,0	7,6	8,8
pH 6,0	99,6	97,7	90,4	87,3	<1,0	1,9	8,2	11,7
pH 6,5	99,3	93,4	89,0	86,9	<1,0	5,6	9,9	12,4
pH 7,0	99,2	93,9	87,4	85,1	<1,0	5,5	11,1	13,5
pH 7,5	99,1	92,8	84,4	81,9	<1,0	6,4	12,9	16,2
pH 9,0	99,3	82,4	61,6	50,6	<1,0	15,4	36,2	47,6

Análisis CEX-FIPLC

El análisis CEX-HPLC detectó el CHIR-12.12 intacto como la especie del pico principal, las variantes ácidas eluyeron más temprano que las especies del pico principal y las variantes de adición de lisina en el extremo C terminal eluyeron después de las especies de pico principal. La Tabla 22 muestra la dependencia de los porcentajes de las especies restantes de CHIR-12.12 del pico principal y las variantes ácidas en el pH de la disolución. La muestra de control ya contenía un alto grado de especies ácidas (aproximadamente 33%), probablemente debido a los procesos

ES 2 333 971 T3

de fermentación de etapa temprana y purificación. La susceptibilidad de CHIR-12.12 a las disoluciones de pH más alto se evidencia por dos hechos. Primero, la muestra de la formulación inicial a pH 9 (t = 0) ya generaba 12% más especies ácidas que el control. Segundo, el porcentaje de especies ácidas aumentó bruscamente con el aumento del pH. La degradación relacionada con el cambio de cargas se debe probablemente a la desamidación. Los datos anteriores indican que este tipo de degradación de CHIR-12.12 se redujo al mínimo a pH de aproximadamente 5,0-5,5.

TABLA 22

10 *Porcentaje de área de picos por CEX-HPLC para CHIR-12.12 en formulaciones de diferente pH bajo condiciones de tiempo real y de almacenamiento acelerado*

Muestra	Pico principal %					Variantes ácidas %				
	t=0	5 °C	25 °C	40 °C	40 °C	t=0	5 °C	25 °C	40 °C	40 °C
		3 m	3 m	1 m	2 m		3 m	3 m	1 m	2 m
Control	49,2	49,8	49,8	49,2	50,3	32,0	33,7	33,7	32,0	33,6
pH 4,5	48,5	49,7	43,7	39,7	30,0	32,5	32,6	38,0	44,2	56,4
pH 5,0	49,6	49,8	48,3	40,6	31,4	32,7	31,8	35,0	44,3	57,1
pH 5,5	50,7	50,3	48,1	40,0	30,2	32,6	31,8	37,8	48,9	63,3
pH 6,0	50,2	49,9	47,9	37,4	23,9	33,1	33,6	38,5	54,9	72,7
pH 6,5	49,4	49,9	42,3	29,7	14,6	33,3	33,6	47,7	65,2	84,6
pH 7,0	49,7	49,9	21,9	-	-	34,4	36,4	64,4	-	-
pH 7,5	49,3	48,3	12,7	-	-	35,5	40,1	79,2	-	-
pH 9,0	41,3	31,8	-	-	-	44,7	59,9	-	-	-

Conclusión

40 El pH tiene un efecto significativo en la estabilidad conformacional y fisicoquímica de CHIR-12.12. Se determinó que la degradación relacionada con el cambio de cargas es la principal vía de degradación para CHIR-12.12, que se redujo al mínimo a pH 5,0-5,5. En base a los datos de estabilidad general, una formulación farmacéutica líquida recomendada que comprende este anticuerpo es una formulación que comprende CHIR-12.12 a una concentración de aproximadamente 20 mg/ml formulada en succinato de sodio aproximadamente 10 mM, cloruro de sodio aproximadamente 150 mM, y que tiene un pH de aproximadamente 5,5.

Ejemplo 26

50 *Estudios clínicos con CHIR-5.9 y CHIR-12.12*

Objetivos clínicos

55 El objetivo general es proporcionar una terapia eficaz para tumores de células B convirtiéndolos en dianas con una IgG1 anti CD40. Estos tumores incluyen linfoma de células B, linfoma linfocítico crónico (CLL), leucemia linfoblástica aguda (ALL), mieloma múltiple (MM), macroglobulinemia de Waldenstrom y enfermedad sistémica de Castleman. La señal para estas enfermedades se determina en fase II aunque puede obtenerse alguna medición de actividad en fase I. Inicialmente, el agente se estudia como un agente único, pero se combinará con otros agentes, quimioterapéuticos, y otros anticuerpos a medida que proceda el desarrollo.

Fase I

- Evaluar la seguridad y la farmacocinética - aumento de dosis en sujetos con neoplasias de células B.
- Elegir la dosis en base a la seguridad, tolerabilidad y cambio en los marcadores séricos de CD40. En general se busca una dosis máxima tolerable (DMT) pero pueden resultar adecuadas otras indicaciones de eficacia (depleción células B CD40+, etc.) para buscar la dosis.

ES 2 333 971 T3

• Considerar más de una dosis especialmente para indicaciones diferentes, por ejemplo, la dosis para CLL puede ser diferente que para NHL. Por consiguiente, puede ser necesaria alguna búsqueda de dosis en fase II.

5 • Los pacientes se dosifican semanalmente con toma de muestras para farmacocinética (Pk) en tiempo real. Inicialmente la dosis máxima permitida es un ciclo de 4 semanas. La Pk puede ser muy variable según la enfermedad estudiada, densidad de CD40, etc.

10 • Este(os) ensayo(s) está(n) abierto(s) a sujetos con linfoma de células B, CLL, y potencialmente otras neoplasias de células B.

• La decisión para interrumpir o continuar los estudios se basa en la seguridad, dosis y pruebas preliminares de actividad antitumoral.

15 • La actividad del fármaco, determinada por la tasa de respuesta, se determina en la Fase II.

• Identificar dosis para la Fase II.

20 Fase II

Se iniciarán varios ensayos en los tipos de tumores mencionados anteriormente con concentración en linfoma de células B, CLL y mieloma múltiple (MM). Pueden ser necesarios ensayos separados en NHL de grado bajo y de grado intermedio/alto ya que el CD40 puede tener una función diferente según el grado del linfoma. En la enfermedad de grado bajo, CD40 actúa más como un factor de supervivencia, previniendo la apoptosis. En la enfermedad de grado más alto, la interrupción de las señales de CD40 puede dar lugar a muerte celular. Puede probarse más de una dosis y más de un programa en una configuración aleatorizada de fase II.

En cada enfermedad, dirigirse a una población que ha fracasado con el tratamiento convencional actual:

30 • CLL: pacientes que fueron resistentes a Campath® y quimioterapia.

• NHL de grado bajo: fracasos con Rituxan® o CHOP-R.

35 • NHL intermedio: fracasos con CHOP-R.

• Mieloma múltiple: fracasos con quimioterapia.

✓ La decisión para interrumpir o continuar con el estudio se basa en la prueba del concepto terapéutico en Fase II.

40 ✓ Determinar si puede usarse un marcador sustituto como indicación temprana para la eficacia clínica.

✓ Identificar las dosis para la Fase III.

45 Fase III

La fase III dependerá de cuándo se detecta la señal en la fase II y de qué terapias competidoras se consideran el patrón de referencia. Si la señal se detecta en una etapa de la enfermedad en la que no hay patrón de referencia de terapia, entonces podrá servir un estudio de un único brazo, bien controlado, como ensayo fundamental. Si hay agentes competidores que se consideran patrones de referencia, entonces se realizan estudios directos.

55

60

65

Referencia de la presentación del solicitante o agente	PP20107.004	Solicitud internacional N°	PCT/US2004/
---	-------------	----------------------------	-------------

INDICACIONES REFERIDAS AL MICROORGANISMO U OTRO MATERIAL BIOLÓGICO
DEPOSITADO
(Regla PCT 13bis)

A. Las siguientes indicaciones se refieren al microorganismo u otro material biológico depositado al que se hace referencia en la descripción en la página 18, renglón 25	
B. IDENTIFICACIÓN DEL DEPÓSITO Se identifican otros depósitos en páginas adicionales <input checked="" type="checkbox"/>	
Nombre de la Institución depositante American Type Culture Collection	
Dirección de la Institución depositante (incluidos código postal y país) 10801 University Blvd. Manassas, VA 20110-2209 EEUU	
Fecha de depósito 17 de septiembre de 2003	Número de acceso PTA-5542
C. OTRAS INDICACIONES (dejar en blanco si no se aplica) Esta información continúa en otra hoja <input type="checkbox"/> Página 22, renglón 20; página 75, renglón 11; página 142, renglón 9	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE REALIZAN LAS INDICACIONES (si los indicadores no son para todos los Estados designados)	
E. OTROS APORTES DE LAS INDICACIONES (dejar en blanco si no se aplica)	
Las indicaciones que se presentan a continuación se enviarán posteriormente a la Oficina Internacional (especificar la naturaleza general de las indicaciones, por ejemplo, "Número de acceso del depósito")	

Sólo para uso de la Oficina receptora <input checked="" type="checkbox"/> Esta hoja se recibió con la solicitud internacional	Sólo para uso de la Oficina Internacional <input type="checkbox"/> Esta hoja se recibió en la Oficina Internacional el:
Funcionario autorizado	Funcionario autorizado

Referencia de la presentación del solicitante o agente	PP20107.004	Solicitud internacional N°	PCT/US2004/
---	-------------	----------------------------	-------------

INDICACIONES REFERIDAS AL MICROORGANISMO U OTRO MATERIAL BIOLÓGICO
DEPOSITADO
(Regla PCT 13bis)

A. Las siguientes indicaciones se refieren al microorganismo u otro material biológico depositado al que se hace referencia en la descripción en la página 18, renglón 25	
B. IDENTIFICACIÓN DEL DEPÓSITO Se identifican otros depósitos en páginas adicionales <input type="checkbox"/>	
Nombre de la Institución depositante American Type Culture Collection	
Dirección de la Institución depositante (incluidos código postal y país) 10801 University Blvd. Manassas, VA 20110-2209 EEUU	
Fecha de depósito 17 de septiembre de 2003	Número de acceso PTA-5543
C. OTRAS INDICACIONES (dejar en blanco si no se aplica) Esta información continúa en otra hoja <input type="checkbox"/>	
Página 22, renglón 20; página 75, renglón 11; página 127, renglón 15; página 142, renglón 10	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE REALIZAN LAS INDICACIONES (si los indicadores no son para todos los Estados designados)	
E. OTROS APORTES DE LAS INDICACIONES (dejar en blanco si no se aplica)	
Las indicaciones que se presentan a continuación se enviarán posteriormente a la Oficina Internacional (especificar la naturaleza general de las indicaciones, por ejemplo, "Número de acceso del depósito")	

Sólo para uso de la Oficina receptora <input checked="" type="checkbox"/> Esta hoja se recibió con la solicitud internacional	Sólo para uso de la Oficina Internacional <input type="checkbox"/> Esta hoja se recibió en la Oficina Internacional el:
Funcionario autorizado	Funcionario autorizado

ATCC

10801 University Blvd. - Manassas, VA 20110-2209 – Teléfono: 703-365-2700 - FAX: 703-365-3746

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE
MICROORGANISMOS A LOS FINES DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

RECEPCIÓN EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL EXPEDIDO CONFORME A LA REGLA 7.3 Y
DECLARACIÓN DE VIABILIDAD EXPEDIDA CONFORME A LA REGLA 10.

Para: (Nombre y dirección del Depositante o Agente)

Chiron Corporation

Agente: Karen Van Noro

4560 Horton Street

Emeryville, CA 94608

Depositado en nombre de: Chiron Corporation

Referencia de identificación por depósito

Designación del depósito de patente

Híbrido de ratón 131.2F8.5.9: CMCC# 12047

PTA-5542

Híbrido de ratón 153.8E2.D10.D6.12.12: CMCC# 12056

PTA-5543

Los depósitos se acompañaron por: una descripción científica, una descripción taxonómica propuesta indicada anteriormente. Los depósitos fueron recibidos el 17 de septiembre de 2003 por esta Autoridad Internacional de Depósito y han sido aceptados.

A SU SOLICITUD: Le informaremos sobre las solicitudes para las cepas durante 30 años.

Las cepas se pondrán a disposición si una oficina de patentes signataria del Tratado de Budapest certifica su derecho para la recepción, o si se expide una Patente de EEUU que cita las cepas, y la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos o el depositante instruyen a la ATCC para entregar dichas cepas.

Si los cultivos mueren o se destruyen durante la vigencia efectiva del depósito, será su responsabilidad reemplazarlos con cultivos vivos de los mismos.

Los cultivos se mantendrán durante un período de al menos 30 años desde la fecha del depósito, o cinco años después de la solicitud más reciente de una muestra, lo que sea más prolongado. Los Estados Unidos y muchos otros países son signatarios del Tratado de Budapest.

La viabilidad de los cultivos citados anteriormente se probó el 23 de septiembre de 2003. En esa fecha, los cultivos fueron viables.

Autoridad Internacional de Depósito: American Type Culture Collection, Manassas, VA 20110-2209 EEUU.

Firma del representante autorizado de la ATCC:

Marie Harris, Especialista en Patentes, Depósito de Patentes de ATCC

Fecha: 2 de octubre de 2003

cc: Lisa Alexander

Ref: Expediente o caso N° P20107.001

Recibido 03-Nov-03 08:20pm

De: 510 823 4755

Para: Propiedad intelectual Página 002

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humano que es capaz de unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expresado en la superficie de una célula humana que expresa CD40, estando dicho anticuerpo monoclonal exento de actividad agonista significativa, por el que, cuando dicho anticuerpo monoclonal se une al antígeno CD40 expresado en la superficie de dicha célula, se inhibe el crecimiento o la diferenciación de dicha célula, en el que dicho anticuerpo se selecciona del grupo constituido por:

- 5 a) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 o al anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543;
- 15 b) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de CD40 humano que se muestra en SEC ID N° 10 ó SEC ID N° 12;
- c) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia de CD40 humano que se muestra en SEC ID N° 10 ó SEC ID N° 12; y
- 20 d) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 o el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543 en un ensayo de unión competitiva.

25

2. Un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo se selecciona del grupo constituido por el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 y el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543.

30

3. Un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo constituido por:

- 35 (i) un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena ligera que contiene los residuos 44-54, 70-76 y 109-117 de SEC ID N° 2;
- (ii) un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene los residuos 50-54, 69-84 y 114-121 de SEC ID N° 4;
- 40 (iii) un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene los residuos 50-54, 69-84 y 114-121 de SEC ID N° 5;
- (iv) un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena ligera que contiene los residuos 44-54, 70-76 y 109-117 de SEC ID N° 6;
- 45 (v) un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene los residuos 50-54, 69-84 y 114-121 de SEC ID N° 7; y
- 50 (vi) un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene los residuos 50-54, 69-84 y 114-121 de SEC ID N° 8,

o es un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo constituido por:

55

- (i) un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena ligera que contiene los residuos 46-52, 70-72 y 111-116 de SEC ID N° 2;
- (ii) un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene los residuos 45-51, 72-74 y 115-120 de SEC ID N° 4;
- 60 (iii) un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene los residuos 45-51, 72-74 y 115-120 de SEC ID N° 5;
- 65 (iv) un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena ligera que contiene los residuos 46-52, 70-72 y 111-116 de SEC ID N° 6;

ES 2 333 971 T3

(v) un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene los residuos 45-51, 72-74 y 115-120 de SEC ID N° 7; y

5 (vi) un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene los residuos 45-51, 72-74 y 115-120 de SEC ID N° 8.

4. Un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por:

10

(i) los residuos 21-132 de SEC ID N° 2;

(ii) los residuos 21-239 de SEC ID N° 2;

15

(iii) SEC ID N° 2;

(iv) los residuos 20-139 de SEC ID N° 4;

20

(v) los residuos 20-469 de SEC ID N° 4;

(vi) SEC ID N° 4;

(vii) los residuos 20-469 de SEC ID N° 5;

25

(viii) SEC ID N° 5;

(ix) los residuos 21-132 de SEC ID N° 2 y los residuos 20-139 de SEC ID N° 4;

(x) los residuos 21-239 de SEC ID N° 2 y los residuos 20-469 de SEC ID N° 4;

30

(xi) los residuos 21-239 de SEC ID N° 2 y los residuos 20-469 de SEC ID N° 5;

(xii) SEC ID N° 2 y SEC ID N° 4; y

35

(xiii) SEC ID N° 2 y SEC ID N° 5.

5. Un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por:

40

(i) los residuos 21-132 de SEC ID N° 6;

(ii) los residuos 21-239 de SEC ID N° 6;

45

(iii) SEC ID N° 6;

(iv) los residuos 20-144 de SEC ID N° 7;

(v) los residuos 20-474 de SEC ID N° 7;

50

(vi) SEC ID N° 7;

(vii) los residuos 20-474 de SEC ID N° 8;

55

(viii) SEC ID N° 8;

(ix) los residuos 21-132 de SEC ID N° 6 y los residuos 20-144 de SEC ID N° 7;

(x) los residuos 21-239 de SEC ID N° 6 y los residuos 20-474 de SEC ID N° 7;

60

(xi) los residuos 21-239 de SEC ID N° 6 y los residuos 20-474 de SEC ID N° 8;

(xii) SEC ID N° 6 y SEC ID N° 7; y

65

(xiii) SEC ID N° 6 y SEC ID N° 8.

ES 2 333 971 T3

6. El anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo monoclonal se une a dicho antígeno CD40 humano con una afinidad (K_D) de al menos 10^{-6} M.

5 7. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 6, en el que dicho anticuerpo monoclonal se une a dicho antígeno CD40 humano con una afinidad (K_D) de al menos 10^{-8} M.

8. El anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo monoclonal es un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo monoclonal, en el que dicho fragmento retiene la capacidad de unirse específicamente a dicho antígeno CD40 humano.

10 9. El fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 8, en el que dicho fragmento se selecciona del grupo constituido por un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento Fv y un fragmento Fv de cadena única.

15 10. El anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo monoclonal se produce en una línea celular CHO.

11. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

20 12. Una línea celular de hibridoma capaz de producir el anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

25 13. Uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en la fabricación de un medicamento para inhibir el crecimiento o la diferenciación de una célula B humana normal.

30 14. Un procedimiento *in vitro* para inhibir el crecimiento o la diferenciación de una célula B humana normal, que comprende poner dicha célula B en contacto con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 según cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

35 15. Uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en la fabricación de un medicamento para inhibir la proliferación de una célula B humana normal, en el que dicha proliferación está aumentada por la interacción de un ligando de CD40 con un antígeno CD40 expresado en la superficie de dicha célula B.

40 16. Un procedimiento *in vitro* para inhibir la proliferación de una célula B humana normal, en el que dicha proliferación está aumentada por la interacción de un ligando de CD40 con un antígeno CD40 expresado en la superficie de dicha célula B, comprendiendo dicho procedimiento poner dicha célula B en contacto con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 según cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

45 17. Uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 o su fragmento según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en la fabricación de un medicamento para inhibir la producción de anticuerpos por células B en un paciente humano.

50 18. Uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en la fabricación de un medicamento para inhibir el crecimiento de células cancerosas de linaje de células B.

55 19. Un procedimiento *in vitro* para inhibir el crecimiento de células cancerosas de linaje de células B, que comprende poner dichas células cancerosas en contacto con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 según cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

20. Uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer **caracterizado** por la expresión de CD40.

60 21. Uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en la fabricación de un medicamento para inhibir una vía de señales de CD40 mediada por ligandos de CD40 en una célula humana que expresa CD40.

65 22. Un procedimiento *in vitro* para inhibir una vía de señales de CD40 mediada por ligandos de CD40 en una célula humana que expresa CD40, comprendiendo dicho procedimiento poner dicha célula en contacto con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 según cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

23. El uso de la reivindicación 21 o el procedimiento de la reivindicación 22, en el que dicha célula humana que expresa CD40 es una célula B humana normal o una célula B humana maligna y dicha vía de señales de CD40 es la supervivencia de la célula B.

ES 2 333 971 T3

24. Un procedimiento *in vitro* para identificar un anticuerpo que tiene actividad antagonista hacia las células que expresan CD40, que comprende realizar un ensayo de unión competitiva con un anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

5 25. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti CD40 según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 26. La composición farmacéutica de la reivindicación 25, en la que dicha composición es una formulación farmacéutica líquida que comprende un tampón en una cantidad par mantener el pH de la formulación en un intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0.

27. La composición farmacéutica de la reivindicación 26, en la que dicha formulación comprende además un agente de isotonicidad en una cantidad suficiente para hacer que la misma composición sea cuasi isotónica.

15 28. La composición farmacéutica de la reivindicación 27, en la que dicho agente de isotonicidad es cloruro de sodio, estando dicho cloruro de sodio presente en dicha formulación en una concentración de aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 300 mM.

20 29. La composición farmacéutica de la reivindicación 28, en la que dicho cloruro de sodio está presente en dicha formulación en una concentración de aproximadamente 150 mM.

30. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 29, en la que dicho tampón se selecciona del grupo constituido por los tampones succinato, citrato y fosfato.

25 31. La composición farmacéutica de la reivindicación 30, en la que dicha formulación comprende dicho tampón en una concentración de aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 50 mM.

32. La composición farmacéutica de la reivindicación 31, en la que dicho tampón es succinato de sodio o citrato de sodio en una concentración de aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 15 mM.

30 33. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 32, en la que dicha formulación comprende además un tensioactivo en una cantidad desde aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 1,0%.

35 34. La composición farmacéutica de la reivindicación 33, en la que dicho tensioactivo es polisorbato 80, que está presente en dicha formulación en una cantidad desde aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 0,5%.

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1A

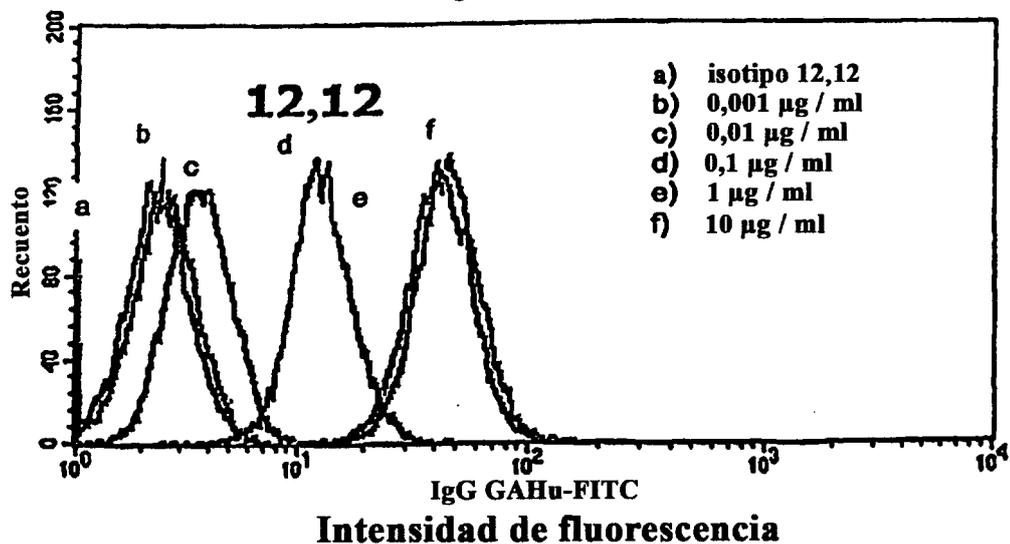
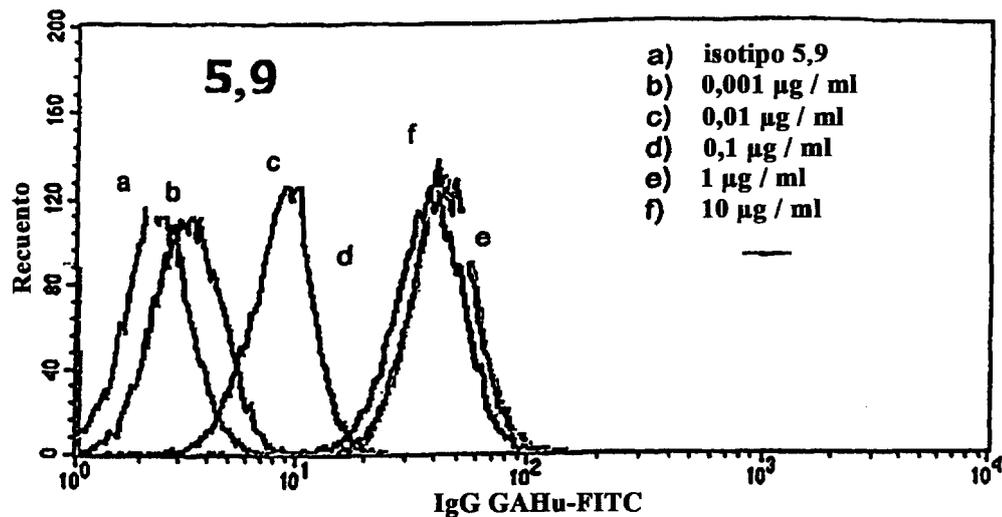


FIGURA 1B

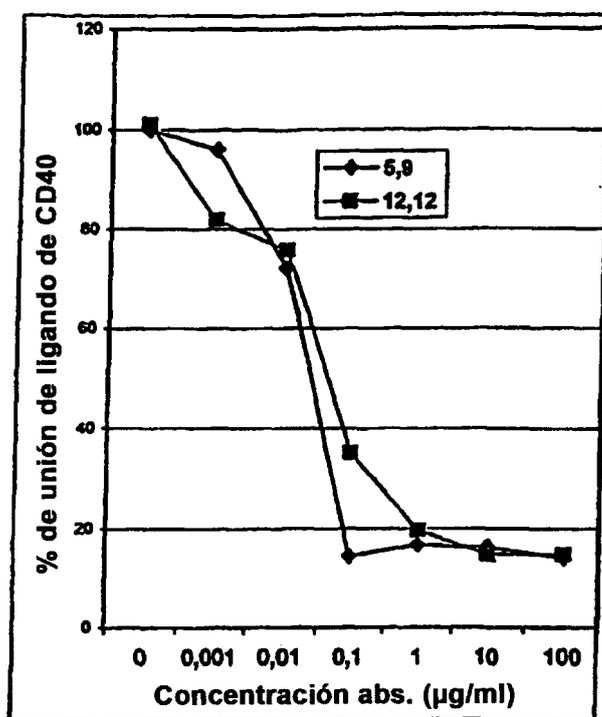


FIGURA 2A

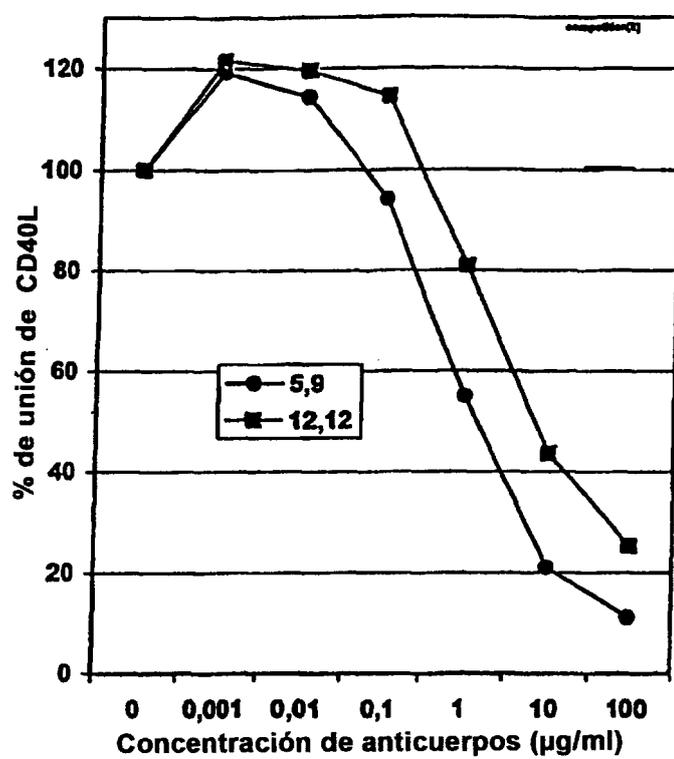


FIGURA 2B

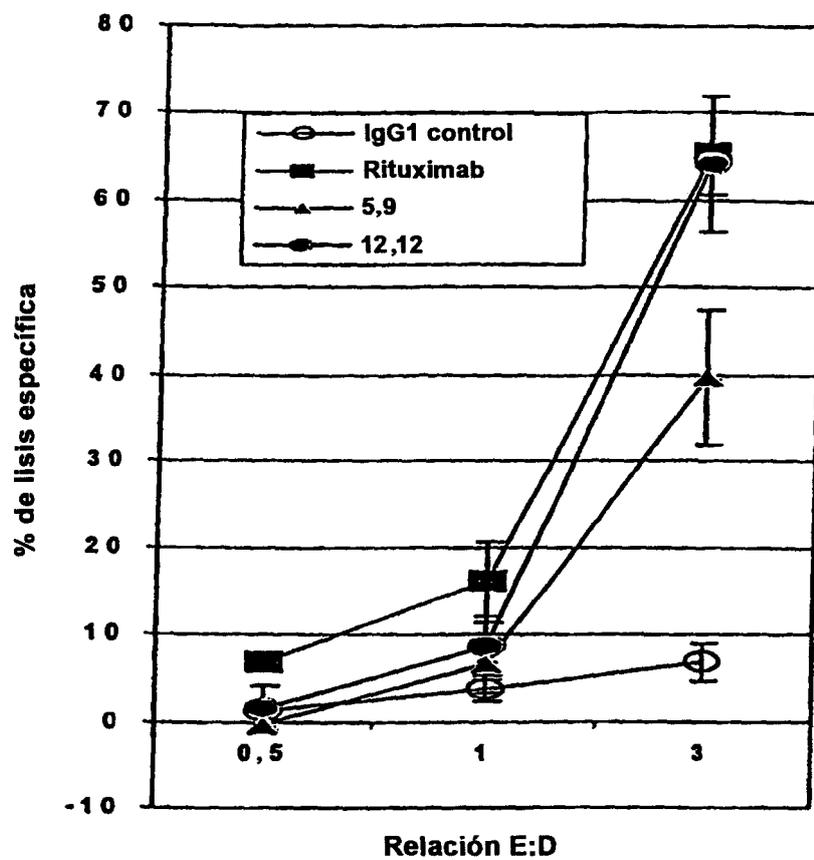


FIGURA 3A

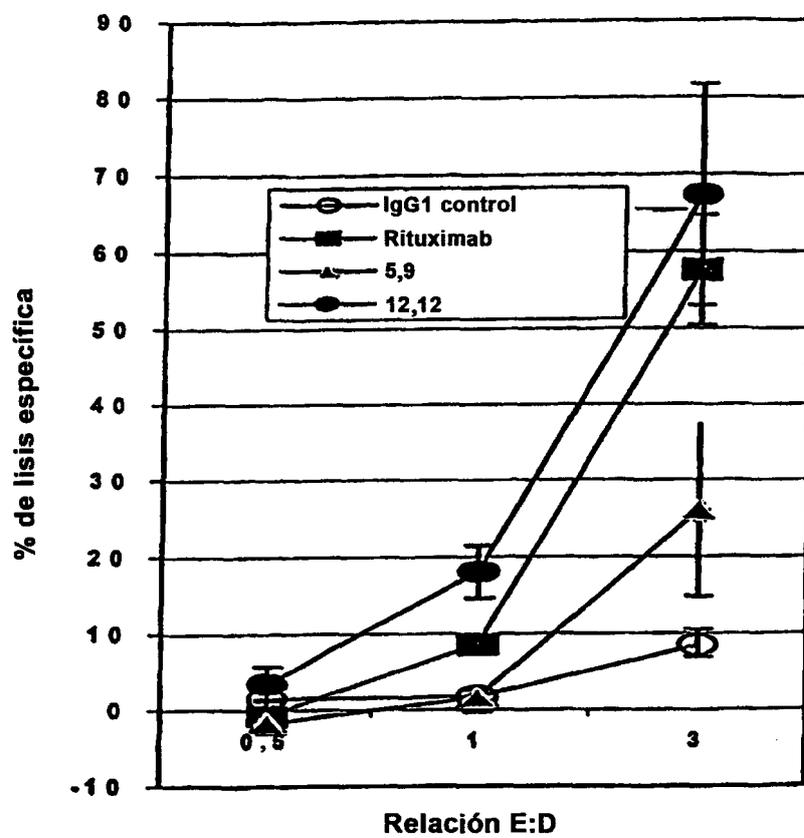


FIGURA 3B

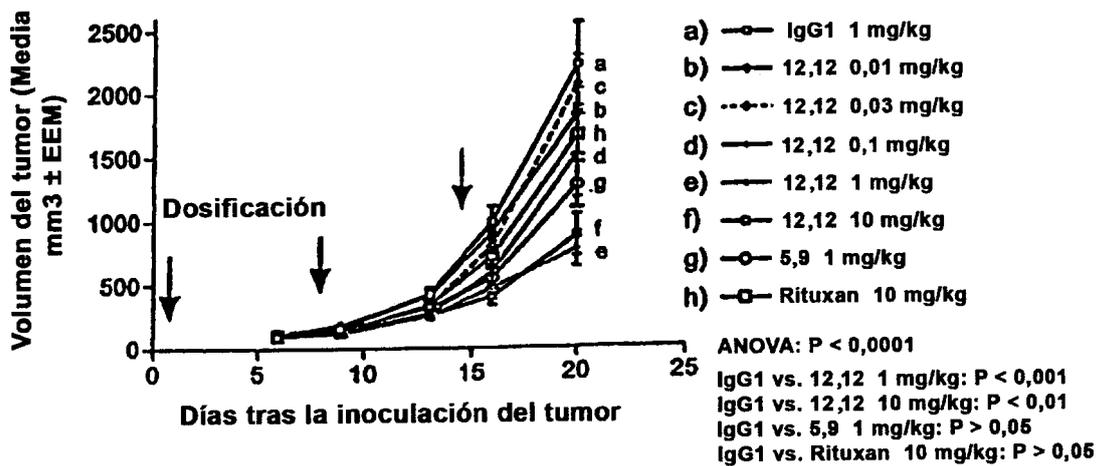


FIGURA 4

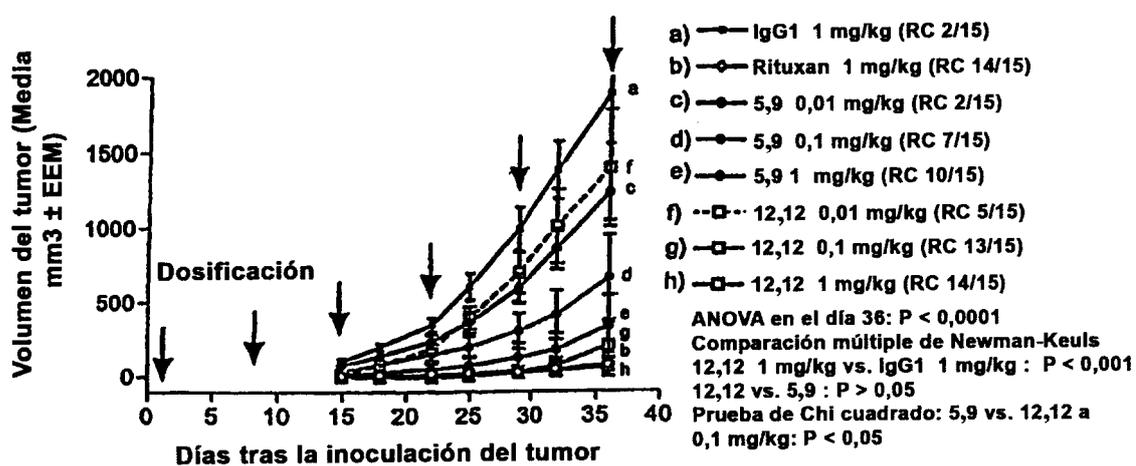


FIGURA 5

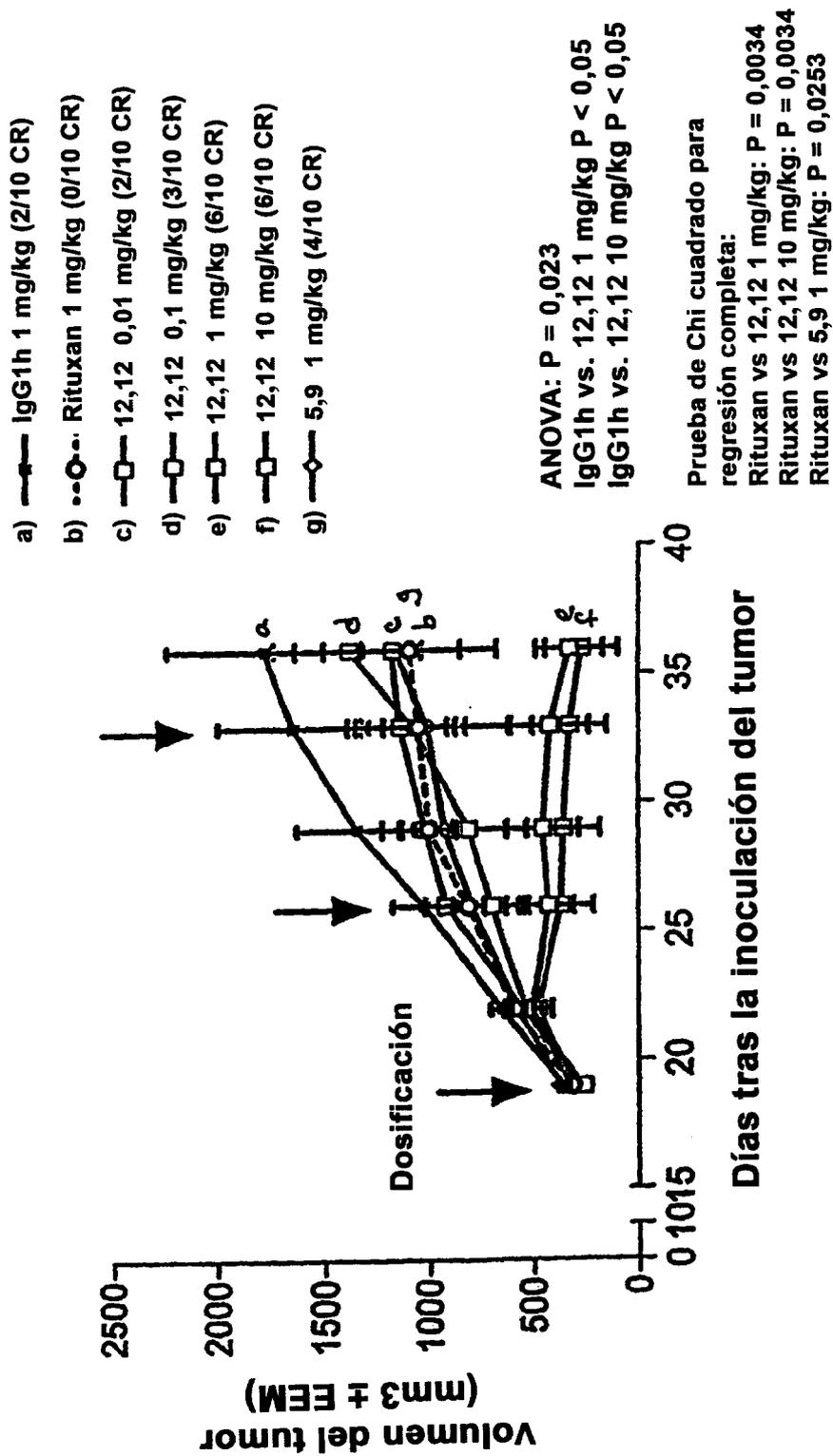


FIGURA 6

Número de moléculas de CD20 y CD40 en células Namalwa y Daudi

Procedimientos:

1. Recoger y lavar las células una vez con PBS sin Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ más BSA al 0,5% y azida de sodio al 0,1%.
 2. Bloquear 1e5 células con Suero humano en PBS sin Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ más azida de sodio al 0,1% en hielo durante 30 minutos.
 3. Tefir las células con anticuerpos conjugados con FITC (12.12-FITC o Rituximab-FITC) sobre hielo durante 40 minutos. Las células también se tifieron con IgG1hu-FITC para control de unión no específica. Las concentraciones de anticuerpos fueron de 0,01, 0,1, 1, 10 y 100 ug por ml.
 4. Determinar el canal medio de fluorescencia (media geométrica) por citometría de flujo usando amplificador log. Se añadió yoduro de propidio (PI) para excluir las células muertas.
 5. Determinar el canal medio de fluorescencia (media geométrica) de Quantum™ 24FITC (3.000 a 5.000 MESF*), Quantum™ 25FITC (50.000 a 20.000.000 MESF*) y Quantum™ 26FITC (10.000 a 500.000 MESF*) con las mismas configuraciones del instrumento que para análisis de las muestras.
- MESF:** Moléculas de fluorocromo soluble equivalente
6. Construir la curva de calibración graficando MESF (eje y) vs. las medias geométricas (eje x).
 7. Se determinó el número de moléculas por célula usando la siguiente ecuación: $y = ax^b$, donde y es igual a MESF y x es igual al canal medio de fluorescencia del ejemplo. El canal medio de fluorescencia usado para cada muestra fue la media geométrica a la concentración de saturación (12.12FITC) o la concentración más alta (rituximabFITC).
 8. Dividir MESF de la muestra por los números de moléculas de FITC conjugadas a cada anticuerpo (relación F:P) para determinar la capacidad de unión del anticuerpo (CUA). La CUA de IgGhuFITC de la muestra respectiva se corrigió para obtener la capacidad de unión del anticuerpo.

Exp.	Daudi		Namalwa	
	CD40	CD20	CD40	CD20
E090403	14403,0	93676,5	3296,4	6200,1
E091003	13214,9	108438,5	3081,5	4788,2
E091103	13702,6	100509,1	3165,7	3988,3
E091203	13278,9	128158,3	3164,9	4618,0
Promedio	13.649,9	107.695,6	3.177,1	4.898,7
Desv. est.	546,7	14915,9	88,8	933,4

FIGURA 7

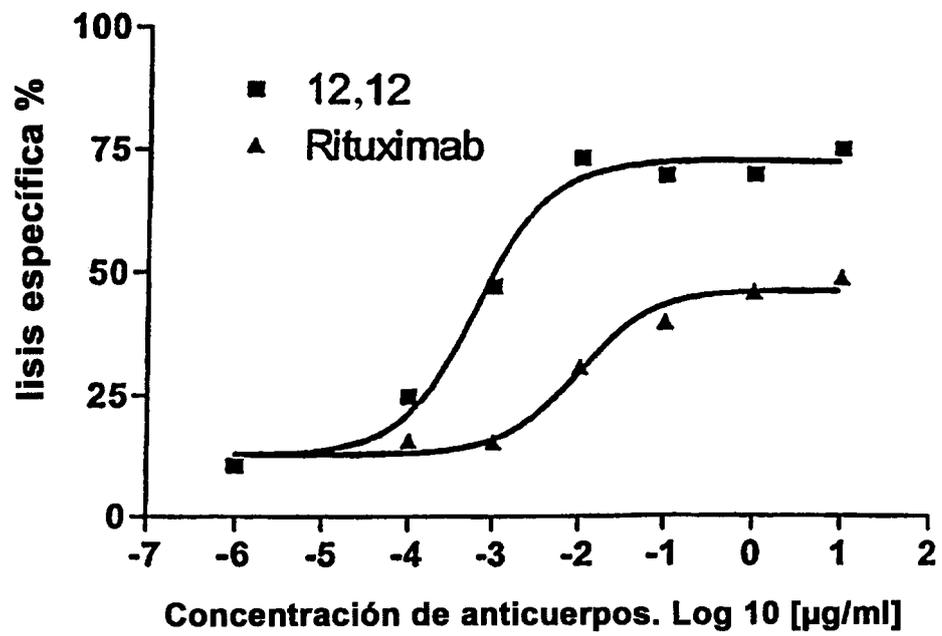


FIGURA 8

FIGURA 9A

Cadena ligera de CHIR 12,12:

líder:

MALPAQLLGLLMLWVSGSSG

variable:

DIVMTQSFSLTVPGEPAISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQVLISLGSNRASG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQARQTPFTFGPGTKVDIR

constante:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIGURA 9B

Cadena pesada de CHIR 12,12:

líder:

MEFGLSWVFLVAILRGVQC

variable:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYYESNRYHAD
SVKGRFTISRDNKITLYLQMNSLRTEDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGLTIVTS

constante:

ASTKGPSVFPLAPASKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YLSLVVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

región constante alternativa:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YLSLVVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURA 10A

Secuencia de ADN de la cadena ligera de CHIR-12,12:

5'atggcgctccctgctcagctcctgggctgctaagctctgggtctctggatccagtggggatattgtgatgactcagctccacttc
cctgaccgtcaccctggagagccggcctccatctcctgcaggccagtcagagcctcctgtatagtaatggatacaactattggattg
gtacctgcagaagccaggcagctccacaggtcctgatctcttgggttctaaticggcctccggggctcctgacaggttcagtgga
gtggatcaggcacagattttacactgaaaatcagcagagtgaggctgaggatgttggggtttactgcatgcaagctcgcacaaact
ccattcactttcggcctgggaccaagtgatatacagacgaactgtggctgaccatctgtctcatctcccgccatctgatgagcagt
tgaaatctggaactgcctctgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaagtgataacgccctcc
aatcgggtaactcccaggagagtgacacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagaccctgacgtgagcaa
agcagactacgagaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcaggcctgagctcggccgtcacaaagagcttcaacaggg
gagagtgtag3'

FIGURA 10B

Secuencia de ADN de la cadena pesada de CHIR-12,12 (incluidos los intrones):

5'atggagttgggctgagctgggtttccttgttctatitaaagggtgctcagtgctcaggtgagtggtggagctgggggaggcgt
ggtccagcctgggaggtcctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtagctatggcatgactgggtccgccaggtc
caggcaaggggctggagtggtggcagttatcatatgaggaaagtaatagataccatgcagactcctgaaaggccgattcacca
tctccagagacaaitccaagatcagctgtatctgcaaatgaacagcctcagaactgaggacacggctgtgtactgtgagagat
gggggtatagcagcactgggctgactactggggcagggaaccctgtcaccgtctcctcagcaagtaccaagggccatcctgt
ctccccctggcggcctgtagcaagagcacctctggggcacagcggcctgggctgcctggtcaaggactactccccgaaccgg
tgacgggtgctggaactcaggcggcctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgtcctacagctcctcaggacttactcctcag
cagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaactgaaacacaagcccagcaacaccaaggtgg
acaagagagttggtgagagggcagcagggagggaggggtgtctgctggaagccaggctcagcgtcctgcctggacgcatccc
gctatgcagctccagtcaggcagcaaggcaggccccgtctgcctctcaccggaggcctctgccgccccactcatgctcagg
gagagggtcttctggcttttccccaggctctggcaggcagcaggttaggtgccctaaccagccctgcacacaaaggggcagg
gtctgggctcagacctgccaagagccatatccgggaggacctgcccctgacctaaagcccaccccaaggccaaactctccactccc
tcagctcggacaccttctctcctccagattccagtaactccaatcttctctcagagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgc
ccaccgtccccaggtaaagccagcccaggcctgcctccagctcaaggcgggacaggtgccctagagtagcctgcatccagggac
aggccccagccgggtgctgacacgtccacctccatcttctcagcactgaactcctggggggaccgtcagctctcctctcccccc
aaaacccaaggacacctcatgatctccggacctgaggtcacatcggtggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtca
agttcaactggtacgtggcggcgtggagggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtagcaaacgacgtaccgtgt
ggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccagactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccc
ccatcagaaaaacctcctccaaagccaaaggtgggacctgtgggtcogaggggccacatggacagaggccggctcggcccacc
tctgcctgagagtgaccgtgtaccaacctctgtcctacagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgg
gagagatgaccagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaggcttctatcccagcagatcggcgtggagtgaggagagcaa
tgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctgactccgacggctccttctctctatagcaagctcaccgtggac
aagagcaggtggcagcagggaacgtctctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcc
ctgtctccgggtaaatga3'

FIGURA 11A

Cadena ligera de CHIR-5,9:

líder:

MALLAQLLGLLMLWVPGSSG

variable:

AIVMTQPPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWLQQRPGQPPRLLIYKFFRRLSG
VPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQVTQFPHTFGQGRLEIK

constante:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIGURA 11B

Cadena pesada de CHIR-5,9:

líder:

MGSTAILALLLAVLQGVCA

variable:

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMMGIIYPGDS DTRYSP
SFQGVVTSADKSI STAYLQWSSLKASDTAMY YCARGTAAGRDYYYYYGM DVWGQGT TTVTVS
S

constante:

ASTKGPSVFPLAPASKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

región constante alternativa:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURA 12A

Secuencia codificadora para la isoforma corta de CD40 humano:

```
1 atggttcgtc tgcctctgca gtgcgtcctc tggggctgct tctgaccgc tgtccatcca
61 gaaccacca ctgcatgcag agaaaaacag tacctaataa acagtcagtg ctgttcttg
121 tgccagccag gacagaaact ggtgagtgac tgcacagagt tcaactgaaac ggaatgcctt
181 ccttgcggtg aaagcgaatt cctagacacc tggaaacagag agacacactg ccaccagcac
241 aaatactgcg accccaacct agggcttcgg gtccagcaga agggcacctc agaaacagac
301 accatctgca cctgtgaaga aggctggcac tgtacgagtg aggcctgtga gagctgtgct
361 ctgcaccgct catgctgcc cggcttggg gtcaagcaga ttgctacagg ggtttctgat
421 accatctgcg agccctgcc agtcggcttc ttccaatg tgcactctgc tticgaaaaa
481 tgcaccctt ggacaaggtc cccaggatcg gctgagagcc ctggtggtga tccccatcat
541 ctctgggatc ctgttgcca tctcttggg gctggtcttt atcaaaaagg tggccaagaa
601 gccaccaat aa
```

FIGURA 12B

Isoforma corta codificada de CD40 humano:

```
1 mvrplqcvl wgciltavhp epptacrekq ylinsqccsl cpggqklvsd cteftetecl
61 pcgesefldt wnrethchqh kydpnlglr vqqkgtsetd tictceegwh ctseacescv
121 lhrscspgfg vkqiatgvsd ticepcpvgf fsnvssafek chpwtrspgs aespqgdphh
181 lrdpvchplg aglyqkggqe anq
```

FIGURA 12C

Secuencia codificadora para la isoforma larga de CD40 humano:

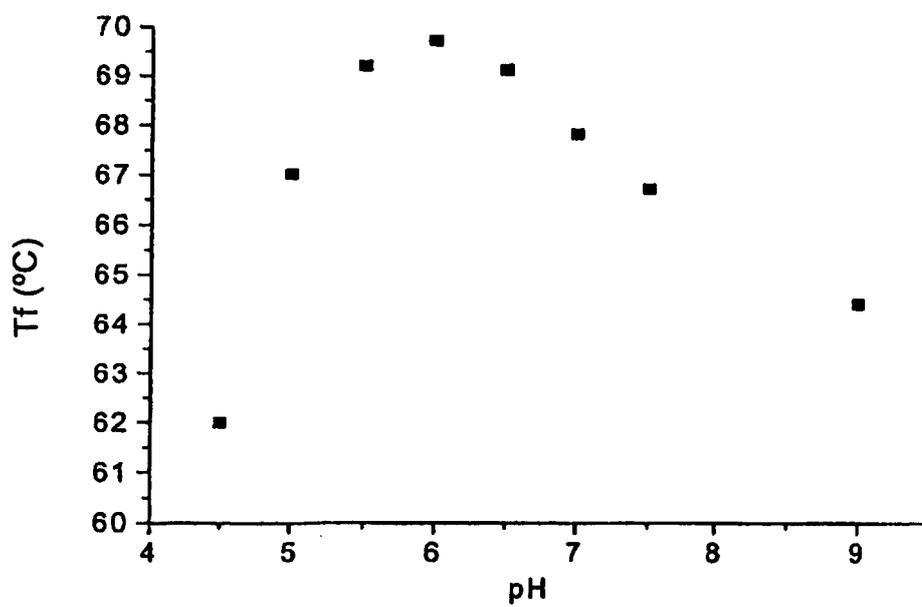
```
1 atggttcgtc tgcctctgca gtgcgtcctc tggggctgct tgctgaccgc tgcctatcca
61 gaaccaccca ctgcatgcag agaaaaacag tacctaataa acagtcagtg ctgttctttg
121 tgccagccag gacagaaact ggtgagtgac tgcacagagt tcaactgaaac ggaatgcctt
181 ccttgccggtg aaagcgaatt cctagacacc tggaaacagag agacacactg ccaccagcac
241 aaatactgcg accccaacct agggcttcgg gtccagcaga agggcacctc agaaacagac
301 accatctgca cctgtgaaga aggctggcac tgtacgagtg aggcctgtga gagctgtgtc
361 ctgcaccgct catgctcgcc cggtttggg gtaagcaga ttgctacagg ggtttctgat
421 accatctgcg agccctgccc agtcggctc tctccaatg tgtcatctgc ttcgaaaaa
481 tgtaccctt ggacaagctg tgagacaaa gacctggttg tgcaacaggc aggcacaaac
541 aagactgatg ttgtctgtgg tcccaggat cggtgagag ccttggtggt gatccccatc
601 atcttcggga tctgtttgc catcctcttg gtgctggtct ttatcaaaaa ggtggccaag
661 aagccaacca ataaggcccc ccacccaag caggaacccc aggagatcaa tttcccgc
721 gatcttctg gctccaacac tegtgtcca gtgcaggaga cttacatgg atgccaaccg
781 gtcaccaggc aggatggcaa agagagtcgc atctcagtc aggagagaca gtga
```

FIGURA 12D

Isoforma larga codificada para CD40 humano:

```
1 mvrhplqcvl wgciltavhp epptacrekq ylinsqccsl cpggqklvsd ctefteteci
61 pcgesefldt wnrethchqh kywdpnlglr vqqkgtsetd tictceegwh ctseacescv
121 lhrscspgfg vkqiatgvsd ticepcpvgf fsnvssafek chpwtscetk dlvvqqagtn
181 ktdvvcgpqd rralvvipi ifgilfail vlvfikkvak kptnkaphpk qepqeinfpd
241 dlpgsntaap vqetlhgcqp vtqedgkesr isvqerq
```

FIGURA 13



ES 2 333 971 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Chen, Bao-Lu
Hurst, Deborah
Lee, Sang Hoon
Long, Li
Lu, Xiaofeng
Luqman, Mohammad
10 Yabannavar, Asha
Zaror, Isabel
- <120> Anticuerpos monoclonales anti CD40 antagonistas y procedimientos para su uso
- 15 <130> PP20107.004 (282916)
- <150> 60/565.710
<151> 27-04-2004
- 20 <150> 60/525.579
<151> 26-11-2003
- 25 <150> 60/517.337
<151> 04-11-2003
- <160> 12
- 30 <170> FastSEQ para Windows Version 4.0
- <210> 1
<211> 720
- 35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
- 40 <223> Secuencia codificadora para cadena ligera del anticuerpo anti CD40 12.12 humano
- <221> CDS
- 45 <222> (1)...(720)
- 50
- 55
- 60
- 65

ES 2 333 971 T3

<400> 1

5 atg gcg ctc cct gct cag ctc ctg ggg ctg cta atg ctc tgg gtc tct 48
 Met Ala Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15

10 gga tcc agt ggg gat att gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg acc 96
 Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Thr
 20 25 30

15 gtc acc cct gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tcc agt cag agc 144
 Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

20 ctc ctg tat agt aat gga tac aac tat ttg gat tgg tac ctg cag aag 192
 Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60

25 cca ggg cag tct cca cag gtc ctg atc tct ttg ggt tct aat cgg gcc 240
 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Val Leu Ile Ser Leu Gly Ser Asn Arg Ala
 65 70 75 80

30 tcc ggg gtc cct gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt 288
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

35 aca ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac 336
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

40 tgc atg caa gct cga caa act cca ttc act ttc ggc cct ggg acc aaa 384
 Cys Met Gln Ala Arg Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
 115 120 125

45 gtg gat atc aga cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg 432
 Val Asp Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140

50 cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg 480
 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160

55 ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat 528
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175

60 aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac 576
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

65 agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa 624
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

70 gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag 672
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

75 ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag 720
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys *
 225 230 235

<210> 2

<211> 239

65 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 333 971 T3

<220>

<223> Cadena ligera del anticuerpo anti CD40 12.12 humano

5

<400> 2

```

Met Ala Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
 1      5      10
Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Thr
      20      25      30
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
      35      40      45
Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys
 50      55      60
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Val Leu Ile Ser Leu Gly Ser Asn Arg Ala
65      70      75
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
      85      90      95
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
      100      105      110
Cys Met Gln Ala Arg Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
      115      120      125
Val Asp Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
      130      135      140
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145      150      155      160
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
      165      170      175
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
      180      185      190
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
      195      200      205
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
      210      215      220
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
40      225      230      235

```

<210> 3

<211> 2016

45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Secuencia codificadora para cadena pesada del anticuerpo anti CD40 12.12 humano (con intrones)

55

60

65

ES 2 333 971 T3

<400> 3

```

5   atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctt gtt gct att tta aga ggt 48
    gtc cag tgt cag gtg cag ttg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag 96
    cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc 144
    agt agc tat ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg 192
    gag tgg gtg gca gtt ata tca tat gag gaa agt aat aga tac cat gca 240
    gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag atc 288
10  tat tac tgt gcg aga gat ggg ggt ata gca gca cct ggg cct gac tac 384
    tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca gca agt acc aag ggc 432
    cca tcc gtc ttc ccc ctg gcg ccc gct agc aag agc acc tct ggg ggc 480
    aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg 528
    acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc 576
15  ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg 624
    acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg 672
    aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt ggt gag agg 720
    cca gca cag gga ggg agg gtg tct gct gga agc cag gct cag cgc tcc 768
    tgc ctg gac gca tcc cgg cta tgc agt ccc agt cca ggg cag caa ggc 816
20  agg ccc cgt ctg cct ctt cac ccg gag gcc tct gcc cgc ccc act cat 864
    gct cag gga gag ggt ctt ctg gct ttt tcc cca ggc tct ggg cag gca 912
    cag gct agg tgc ccc taa ccc agg ccc tgc aca caa agg ggc agg tgc 960
    tgg gct cag acc tgc caa gag cca tat ccg gga gga ccc tgc ccc tga 1008
    cct aag ccc acc cca aag gcc aaa ctc tcc act ccc tca gct cgg aca 1056
25  cct tct ctc ctc cca gat tcc agt aac tcc caa tct tct ctc tgc aga 1104
    gcc caa atc ttg tga caa aac tca cac atg ccc acc gtg ccc agg taa 1152
    gcc agc cca ggc ctc gcc ctc cag ctc aag gcg gga cag gtg ccc tag 1200
    agt agc ctg cat cca ggg aca ggc ccc agc cgg gtg ctg aca cgt cca 1248
    cct cca tct ctt cct cag cac ctg aac tcc tgg ggg gac cgt cag tct 1296
30  tcc tct tcc ccc caa aac cca agg aca ccc tca tga tct ccc gga ccc 1344
    ctg agg tca cat gcg tgg tgg tgg acg tga gcc acg aag acc ctg agg 1392
    tca agt tca act ggt acg tgg acg gcg tgg agg tgc ata atg cca aga 1440
    caa agc cgc ggg agg agc agt aca aca gca cgt acc gtg tgg tca gcg 1488
    tcc tca ccg tcc tgc acc agg act ggc tga atg gca agg agt aca agt 1536
35  gca agg tct cca aca aag ccc tcc cag ccc cca tcg aga aaa cca tct 1584
    cca aag cca aag gtg gga ccc gtg ggg tgc gag ggc cac atg gac aga 1632
    ggc cgg ctc ggc cca ccc tct gcc ctg aga gtg acc gct gta cca acc 1680
    tct gtc cct aca ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc 1728
    cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg 1776
40  gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat 1824
    ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc 1872
    gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg 1920
    tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg 1968

```

```

45  cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 2016

```

```

50  <210> 4
    <211> 469
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial
55  <220>
    <223> Cadena pesada del anticuerpo anti CD40 12.12 humano
60
65

```

ES 2 333 971 T3

<400> 4

5 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 10 Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ile
 85 90 95
 15 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140
 20 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ala Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 145 150 155 160
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175
 25 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 210 215 220
 30 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
 225 230 235 240
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 245 250 255
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270
 35 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300
 40 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 305 310 315 320
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 340 345 350
 45 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 370 375 380
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400
 50 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430

55 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460
 60 Leu Ser Pro Gly Lys
 465

<210> 5

65 <211> 469

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 333 971 T3

<220>

<223> Cadena pesada de la variante del anticuerpo anti CD40 12.12 humano

5 <400> 5

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ile
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 145 150 155 160
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 210 215 220
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
 225 230 235 240
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 245 250 255
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val
 275 280 285
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 305 310 315 320
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 340 345 350
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 370 375 380
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460
 Leu Ser Pro Gly Lys
 465

ES 2 333 971 T3

<210> 6

<211> 239

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera del anticuerpo anti CD40 5.9 humano

10

<400> 6

```

15      Met Ala Leu Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Pro
        1          5          10
      Gly Ser Ser Gly Ala Ile Val Met Thr Gln Pro Pro Leu Ser Ser Pro
        20          25          30
      Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
        35          40          45
20      Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg
        50          55          60
      Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Phe Phe Arg Arg Leu
        65          70          75
25      Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe
        85          90          95
      Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
        100         105         110
30      Cys Met Gln Val Thr Gln Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg
        115         120         125
      Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
        130         135         140
35      Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
        145         150         155
      Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
        165         170         175
40      Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
        180         185         190
      Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
        195         200         205
45      Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
        210         215         220
      Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
        225         230         235

```

45

<210> 7

<211> 474

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada del anticuerpo anti CD40 5.9 humano

55

60

65

ES 2 333 971 T3

<400> 7

	Met	Gly	Ser	Thr	Ala	Ile	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Ala	Val	Leu	Gln	Gl:
	1				5				10						15	
5																
	Val	Cys	Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys
				20					25					30		
10	Pro	Gly	Glu	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe
			35					40					45			
	Thr	Ser	Tyr	Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
			50				55					60				
15	Glu	Trp	Met	Gly	Ile	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser
	65					70				75						80
	Pro	Ser	Phe	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser
				85						90					95	
	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met
				100					105					110		
20	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Thr	Ala	Ala	Gly	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr
			115					120					125			
	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser
			130				135					140				
25	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ala	Ser	Lys
	145					150					155					160
	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
				165						170						175
	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
				180					185					190		
30	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
			195					200					205			
	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
				210			215						220			
	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
	225					230					235					240
35	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
				245						250						255
	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
				260					265					270		
	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
				275				280					285			
40	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
				290			295					300				
	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
	305					310					315					320
	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
				325						330						335
45	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
				340					345					350		
	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
				355				360					365			
50	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
				370			375					380				
	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
	385					390					395					400
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
				405						410						415
55	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
				420					425					430		
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
				435				440					445			
60	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
				450			455					460				
	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
	465						470									

<210> 8

65 <211> 474

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 333 971 T3

<220>

<223> Cadena pesada de la variante del anticuerpo anti CD40 5.9 humano

5

<400> 8

	Met	Gly	Ser	Thr	Ala	Ile	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Ala	Val	Leu	Gln	Gly
	1				5					10					15	
10	Val	Cys	Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys
				20					25					30		
	Pro	Gly	Glu	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe
			35					40					45			
15	Thr	Ser	Tyr	Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
		50				55						60				
	Glu	Trp	Met	Gly	Ile	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser
	65				70					75						80
	Pro	Ser	Phe	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser
				85						90					95	
20	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met
				100					105						110	
	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Thr	Ala	Ala	Gly	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr
			115					120					125			
25	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser
		130					135					140				
	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
	145				150						155					160
	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
				165						170					175	
30	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
				180					185						190	
	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
			195					200					205			
35	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
		210					215						220			
	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
	225					230					235					240
	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
				245						250					255	
40	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
				260					265						270	
	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
			275					280					285			
	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
		290					295					300				
45	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
	305					310					315					320
	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
				325						330					335	
50	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
				340					345						350	
	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
			355					360						365		
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
		370					375						380			
55	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
	385					390					395					400
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
				405						410					415	
60	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
				420					425						430	
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
			435					440					445			
	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
			450				455					460				
65	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
	465					470										

ES 2 333 971 T3

<210> 9
 <211> 612
 <212> ADN
 5 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)...(612)
 <221> característica miscelánea
 <222> (0)...(0)
 15 <223> Secuencia codificadora para la isoforma corta del CD40 humano

<400> 9

20	atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctc tgg ggc tgc ttg ctg acc	48
	Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr	
	1 5 10 15	
25	gct gtc cat cca gaa cca ccc act gca tgc aga gaa aaa cag tac cta	96
	Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu	
	20 25 30	
30	ata aac agt cag tgc tgt tct ttg tgc cag cca gga cag aaa ctg gtg	144
	Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val	
	35 40 45	
35	agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc ctt cct tgc ggt gaa	192
	Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu	
	50 55 60	
40	agc gaa ttc cta gac acc tgg aac aga gag aca cac tgc cac cag cac	240
	Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His	
	65 70 75 80	
45	aaa tac tgc gac ccc aac cta ggg ctt cgg gtc cag cag aag ggc acc	288
	Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr	
	85 90 95	
50	tca gaa aca gac acc atc tgc acc tgt gaa gaa ggc tgg cac tgt acg	336
	Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr	
	100 105 110	
55	agt gag gcc tgt gag agc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tgc ccc ggc	384
	Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly	
	115 120 125	
60	ttt ggg gtc aag cag att gct aca ggg gtt tct gat acc atc tgc gag	432
	Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu	
	130 135 140	
65	ccc tgc cca gtc ggc ttc ttc tcc aat gtg tca tct gct ttc gaa aaa	480
	Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys	
	145 150 155 160	
70	tgt cac cct tgg aca agg tcc cca gga tgc gct gag agc cct ggt ggt	528
	Cys His Pro Trp Thr Arg Ser Pro Gly Ser Ala Glu Ser Pro Gly Gly	
	165 170 175	
75	gat ccc cat cat ctt cgg gat cct gtt tgc cat cct ctt ggt gct ggt	576
	Asp Pro His His Leu Arg Asp Pro Val Cys His Pro Leu Gly Ala Gly	
	180 185 190	
80	ctt tat caa aaa ggt ggc caa gaa gcc aac caa taa	612
	Leu Tyr Gln Lys Gly Gly Gln Glu Ala Asn Gln *	
	195 200	

ES 2 333 971 T3

<210> 10

<211> 203

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

```

Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
1          5          10          15
Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu
          20          25          30
Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val
          35          40          45
Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu
15          50          55          60
Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His
65          70          75          80
Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr
          85          90          95
Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
20          100         105         110
Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
          115         120         125
Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
25          130         135         140
Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
145          150         155         160
Cys His Pro Trp Thr Arg Ser Pro Gly Ser Ala Glu Ser Pro Gly Gly
          165         170         175
Asp Pro His His Leu Arg Asp Pro Val Cys His Pro Leu Gly Ala Gly
30          180         185         190
Leu Tyr Gln Lys Gly Gly Gln Glu Ala Asn Gln
          195         200

```

<210> 11

35 <211> 834

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

40 <220>

<221> CDS

<222> (1)...(834)

45 <221> característica miscelánea

<222> (0)...(0)

<223> Secuencia codificadora para la isoforma larga del CD40 humano

50 <400> 11

```

atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctc tgg ggc tgc ttg ctg acc 48
Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
55          5          10          15
gct gtc cat cca gaa cca ccc act gca tgc aga gaa aaa cag tac cta 96
Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu
          20          25          30
ata aac agt cag tgc tgt tct ttg tgc cag cca gga cag aaa ctg gtg 144
Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val
          35          40          45
agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc ctt cct tgc ggt gaa 192
Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu
65          50          55          60
agc gaa ttc cta gac acc tgg aac aga gag aca cac tgc cac cag cac 240

```

ES 2 333 971 T3

	Ser	Glu	Phe	Leu	Asp	Thr	Trp	Asn	Arg	Glu	Thr	His	Cys	His	Gln	His	
	65					70					75				80		
5	aaa	tac	tgc	gac	ccc	aac	cta	ggg	ctt	egg	gtc	cag	cag	aag	ggc	acc	288
	Lys	Tyr	Cys	Asp	Pro	Asn	Leu	Gly	Leu	Arg	Val	Gln	Gln	Lys	Gly	Thr	
					85					90					95		
10	tca	gaa	aca	gac	acc	atc	tgc	acc	tgt	gaa	gaa	ggc	tgg	cac	tgt	acg	336
	Ser	Glu	Thr	Asp	Thr	Ile	Cys	Thr	Cys	Glu	Glu	Gly	Trp	His	Cys	Thr	
				100					105					110			
15	agt	gag	gcc	tgt	gag	agc	tgt	gtc	ctg	cac	cgc	tca	tgc	tcg	ccc	ggc	384
	Ser	Glu	Ala	Cys	Glu	Ser	Cys	Val	Leu	His	Arg	Ser	Cys	Ser	Pro	Gly	
			115					120					125				
20	ttt	ggg	gtc	aag	cag	att	gct	aca	ggg	gtt	tct	gat	acc	atc	tgc	gag	432
	Phe	Gly	Val	Lys	Gln	Ile	Ala	Thr	Gly	Val	Ser	Asp	Thr	Ile	Cys	Glu	
		130				135						140					
25	ccc	tgc	cca	gtc	ggc	ttc	ttc	tcc	aat	gtg	tca	tct	gct	ttc	gaa	aaa	480
	Pro	Cys	Pro	Val	Gly	Phe	Phe	Ser	Asn	Val	Ser	Ser	Ala	Phe	Glu	Lys	
		145				150					155					160	
30	tgt	cac	cct	tgg	aca	agc	tgt	gag	acc	aaa	gac	ctg	gtt	gtg	caa	cag	528
	Cys	His	Pro	Trp	Thr	Ser	Cys	Glu	Thr	Lys	Asp	Leu	Val	Val	Gln	Gln	
					165					170					175		
35	gca	ggc	aca	aac	aag	act	gat	ggt	gtc	tgt	ggt	ccc	cag	gat	cgg	ctg	576
	Ala	Gly	Thr	Asn	Lys	Thr	Asp	Val	Val	Cys	Gly	Pro	Gln	Asp	Arg	Leu	
				180					185					190			
40	aga	gcc	ctg	gtg	gtg	atc	ccc	atc	atc	ttc	ggg	atc	ctg	ttt	gcc	atc	624
	Arg	Ala	Leu	Val	Val	Ile	Pro	Ile	Ile	Phe	Gly	Ile	Leu	Phe	Ala	Ile	
				195				200					205				
45	ctc	ttg	gtg	ctg	gtc	ttt	atc	aaa	aag	gtg	gcc	aag	aag	cca	acc	aat	672
	Leu	Leu	Val	Leu	Val	Phe	Ile	Lys	Lys	Val	Ala	Lys	Lys	Pro	Thr	Asn	
		210					215					220					
50	aag	gcc	ccc	cac	ccc	aag	cag	gaa	ccc	cag	gag	atc	aat	ttt	ccc	gac	720
	Lys	Ala	Pro	His	Pro	Lys	Gln	Glu	Pro	Gln	Glu	Ile	Asn	Phe	Pro	Asp	
		225				230					235				240		
55	gat	ctt	cct	ggc	tcc	aac	act	gct	gct	cca	gtg	cag	gag	act	tta	cat	768
	Asp	Leu	Pro	Gly	Ser	Asn	Thr	Ala	Ala	Pro	Val	Gln	Glu	Thr	Leu	His	
					245					250					255		
60	gga	tgc	caa	ccg	gtc	acc	cag	gag	gat	ggc	aaa	gag	agt	cgc	atc	tca	816
	Gly	Cys	Gln	Pro	Val	Thr	Gln	Glu	Asp	Gly	Lys	Glu	Ser	Arg	Ile	Ser	
				260					265					270			
65	gtg	cag	gag	aga	cag	tga											834
	Val	Gln	Glu	Arg	Gln	*											
				275													

<210> 12

<211> 277

60 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 333 971 T3

<400> 12

5 Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
1 5 10 15
Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu
20 25 30

10 Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val
35 40 45
Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu
50 55 60
15 Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His
65 70 75 80
Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr
85 90 95
20 Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
100 105 110
Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
115 120 125
Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
130 135 140
25 Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
145 150 155 160
Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln
165 170 175
Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu
180 185 190
30 Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile
195 200 205
Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn
210 215 220
Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp
225 230 235 240
Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His
245 250 255
35 Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser
260 265 270
40 Val Gln Glu Arg Gln
275

45

50

55

60

65