

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 566**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.06.2016** **PCT/US2016/039785**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.09.2017** **WO17151176**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2016** **E 16736717 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2024** **EP 3423489**

54 Título: **Anticuerpos contra CD40 con actividad agonista mejorada**

30 Prioridad:

04.03.2016 US 201662304012 P

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

06.11.2024

73 Titular/es:

THE ROCKEFELLER UNIVERSITY (100.0%)
1230 York Avenue
New York, NY 10065, US

72 Inventor/es:

RAVETCH, JEFFREY, V. y
DAHAN, RONY

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 985 566 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 contra CD40 con actividad agonista mejorada

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de patente U.S. n.º de serie 62/304.012, presentada el 4 de diciembre de 2016.

10 Antecedentes

Investigación reciente ha revelado que los cánceres humanos y las infecciones crónicas pueden tratarse con agentes que modulan la respuesta inmunitaria del paciente a células malignas o infectadas. Ver, p. ej., Reck y Paz-Ares (2015) Semin. Oncol. 42:402. Los anticuerpos agonistas anti-CD40, tales como CP-870893 y dacetuzumab (SGN-40) han sido probados para tratar el cáncer basándose en la creencia de que podrían mejorar dicha respuesta inmunitaria. Ver, p. ej., Kirkwood et al. (2012) CA Cancer J. Clin. 62:309; Vanderheide y Glennie (2013) Clin. Cancer Res. 19:1035. Los experimentos recientes en ratones han revelado que los anticuerpos anti-CD40 con mayor especificidad para el receptor de Fc inhibidor FcγRIIb han aumentado la eficacia antitumoral. Ver, p. ej., el documento n.º WO 2012/087928; Smith, et al. (2012) PNAS 109(16):6181-6; Li y Ravetch (2012) Proc. Nat'l Acad. Sci (USA) 109:10966; Wilson et al. (2011) Cancer Cell 19:101; White et al. (2011) J. Immunol. 187:1754.

Existe la necesidad de mejorar los anticuerpos agonistas anti-CD40 humanos para el tratamiento del cáncer y las infecciones crónicas en sujetos humanos. Dichos anticuerpos preferentemente presentarán una especificidad incrementada para el receptor de Fc inhibidor FcγRIIb en comparación con los receptores de Fc activadores, y mostrarán una actividad antitumoral y/o antiinfecciosa incrementada.

25 Descripción resumida de la invención

Las realizaciones de la invención se exponen en el conjunto adjunto de reivindicaciones.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que:

- (i) se une específicamente a CD40 humano, y
- (ii) comprende una cadena pesada que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 7 y una cadena ligera que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 2.

En otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, de la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula transformada con un vector de expresión de la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-CD40 humano, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende:

- a) expresar el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, en la célula de la invención, y
- b) aislar el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, a partir de la célula.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende:

- a) el anticuerpo, o porción de unión a antígeno, de la invención, y
- b) un portador.

En otro aspecto, la invención proporciona la composición farmacéutica de la invención, para la utilización en terapia.

En otro aspecto, la invención proporciona la composición farmacéutica de la invención, para la utilización en un método de estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto que la necesita, en donde el sujeto presenta un tumor y se estimula una respuesta inmunitaria contra el tumor.

En otro aspecto, la invención proporciona la composición farmacéutica de la invención, para la utilización en un método de estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto que la necesita, en donde el sujeto presenta una infección vírica crónica y se estimula una respuesta inmunitaria contra la infección vírica.

En otro aspecto, la invención proporciona la composición farmacéutica de la invención, para la utilización en el tratamiento del cáncer.

En otro aspecto, la invención proporciona la composición farmacéutica de la invención, para la utilización en el tratamiento de una infección vírica crónica.

Cualesquiera referencias en la descripción a métodos de tratamiento se refieren a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para la utilización en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para el diagnóstico).

En la presente memoria se proporcionan anticuerpos monoclonales aislados (p. ej., anticuerpos monoclonales murinos, anticuerpos monoclonales murinos humanizados y anticuerpos monoclonales humanos) que se unen específicamente a CD40 humano (la secuencia madura de SEC ID n.º 11). El anticuerpo aislado de la invención presenta una región Fc modificada que mejora la especificidad de unión al receptor de FcγRIIb. El anticuerpo aislado de la presente invención comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende las secuencias CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y la cadena ligera comprende CDRL1, CDRL2 y CDRL3 y las Fc variantes G237D/P238D/H268D/P271G/A330R ("V11"), tal como se indica en la Tabla 2.

La Fc variante es V11 (SEC ID n.º 2 y n.º 7). Los anticuerpos anti-CD40hu de la presente invención comprenden regiones Fc modificadas con mayor especificidad de unión a FcγRIIb, y no a receptores activadores, que los anticuerpos con regiones Fc naturales. En determinadas realizaciones la proporción A/I para el anticuerpo anti-CD40hu de la presente invención es inferior a 5, y en las realizaciones preferentes, inferior a 1.

El anticuerpo anti-CD40hu de la presente invención comprende una o más cadenas pesadas y una o más cadenas ligeras, tal como dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras.

El anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo de la invención presenta una mayor especificidad de unión a FcγRIIb.

La presente invención proporciona, además, ácidos nucleicos que codifican las regiones variables de cadena pesada y/o ligera, de los anticuerpos anti-CD40 de la presente invención, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, vectores de expresión que comprenden las moléculas de ácido nucleico, células transformadas con los vectores de expresión, y métodos de producción de los anticuerpos mediante la expresión de los anticuerpos a partir de las células transformadas con los vectores de expresión y la recuperación del anticuerpo.

La presente invención proporciona, además, composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-CD40hu de la presente invención, o fragmentos de unión de antígenos de los mismos, y un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona un método para mejorar una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD40hu de la presente invención, o fragmento de unión a antígeno del mismo, al sujeto de tal manera que se incrementa una respuesta inmunitaria en el sujeto; en donde el sujeto presenta un tumor y se potencia una respuesta inmunitaria contra el tumor, o en donde el sujeto presenta una infección vírica, por ejemplo, una infección vírica crónica y se potencia la respuesta inmunitaria antivírica.

La presente invención proporciona, además, un método para inhibir el crecimiento de tumores en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de un anticuerpo anti-CD40hu de la presente invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de tal manera que se inhibe el crecimiento del tumor.

La presente invención proporciona, además, un método de tratamiento del cáncer, p. ej., mediante inmunoterapia, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40hu de la presente invención, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, p. ej., en forma de una composición farmacéutica, tratando de esta manera el cáncer. En determinadas realizaciones, el cáncer es cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer uterino/cervical, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de esófago, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pulmonar, cáncer de estómago, cáncer de células germinales, cáncer óseo, cáncer de hígado, cáncer de tiroides, cáncer de piel, neoplasia del sistema nervioso central, linfoma, leucemia, mieloma, sarcoma, y cáncer relacionado con virus. En determinadas realizaciones, el cáncer es un cáncer metastásico, un cáncer resistente al tratamiento o un cáncer recurrente.

En determinadas realizaciones, los métodos de modulación de la función inmunitaria y los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria comprenden la administración de un anticuerpo anti-CD40hu de la presente invención en combinación con uno o más terapéuticos adicionales o como un reactivo biespecífico con los mismos, por ejemplo, un segundo anticuerpo inmunomodulador.

Breve descripción de los dibujos

Las FIG. 1A, 1B, 1C y 1D muestran la caracterización de ratones humanizados CD40/FcyR y 2141 Fc variantes anti-CD40. La FIG. 1A es una tinción representativa de citometría de flujo de CD40 de ratón o humano en las poblaciones de células esplénicas indicadas de ratones CD40^{-/-} CD40hu^{+/+} y de tipo salvaje. La FIG. 1B es una tinción representativa de citometría de flujo de células B GC de LN mesentérica del tipo de ratón indicado. Se agruparon en el análisis las células B220⁺ vivas. Las células B GC se indican como CD38-Fashi. La FIG. 1C ilustra un ELISA para la detección de los niveles séricos de IgG específico de influenza H1N1 en ratones inmunizados con influenza H1N1 recombinante. Cada punto representa un ratón individual. La FIG. 1D ilustra la especificidad de unión de las Fc variantes indicadas del clon de anticuerpo anti-CD40 2141 evaluadas mediante ELISA utilizando CD40hu recombinante. Los datos se presentan como medias. Ver también la Tabla 1.

La FIG. 2 muestra la unión de CD40hu a CD40L de ratón y humano mediante análisis de SPR con CD40 humano inmovilizado y CD40L humano/ratón soluble titulado de 33 a 0,5 nM.

Las FIG. 3A y 3B muestran que los mAb de CD40 humanos requieren el acoplamiento de FcyR para la actividad *in vivo*. La FIG. 3A muestra el perfil de unión de los FcyR de Fc anti-CD40 de 2141 variantes. Ver también la Tabla 2. La FIG. 3B muestra el análisis de citometría de flujo para células T CD8⁺ específicas de OVA en la sangre de ratones CD40/FcyR humanizados e inmunizados con DEC-OVA en presencia o ausencia de las Fc variantes anti-CD40 CP-890.873 (izquierda) o ChiLob 7/4 (derecha) indicadas. Cada punto representa un ratón individual.

Las FIG. 4A, 4B, 4C y 4D muestran una mayor actividad de CP-870.893 con la manipulación de Fc para la mejora específica de FcyRIIB. La FIG. 4A indica el factor de cambio en las afinidades de unión de FcyRIIBhu y FcyRIIBhu/FcyRIIAhu^{R131} de para Fc variantes anti-CD40 de 2141, basado en mediciones de SPR. Ver también la Tabla 2. La FIG. 4B muestra el análisis de citometría de flujo para células T CD8⁺ específicas de OVA en la sangre de ratones CD40_{hu}/FcyR inmunizados con DEC-OVA en presencia o ausencia de las Fc variantes anti-CD40 CP-890.873 indicadas. Cada punto representa un ratón individual. La FIG. 4C muestra los recuentos de plaquetas en sangre 24 horas después de la administración de Fc variantes anti-CD40 CP-870.893 en ratones CD40/FcyR humanizados. Cada punto representa un ratón individual. La FIG. 4D muestra que CD40⁺_{hu}/FcyRIIA⁺_{hu}/FcyRIIB⁺_{hu} o CD40⁺_{hu}/FcyRIIA⁺_{hu}/FcyRIIB⁺_{hu} fueron inmunizados con DEC-OVA en presencia de CP-870,893-IgG2 y analizados para los porcentajes de células T CD8⁺ específicas de OVA en sangre el día 7. Ver también la Tabla 2.

Las FIG. 5A y 5B muestran una mayor actividad de CP-870.893 por manipulación de Fc para la mejora específica de FcyRIIB. La FIG. 5A muestra el cambio en el peso corporal total a lo largo del tiempo después de la inyección única de la variante de Fc CP-870.893 en ratones FcyR/CD40 humanizados. Los datos se representan como media $\pm$ SEM. n=4. La FIG. 5B muestra el recuento de plaquetas en sangre de ratones CD40/FcyR humanizados 7 días después de la administración de Fc variantes anti-CD40 CP-870.893. Cada punto representa un ratón individual.

Descripción detallada

La presente invención proporciona anticuerpos aislados, particularmente anticuerpos monoclonales, p. ej., anticuerpos monoclonales humanizados o humanos, que se unen específicamente a CD40 humano ("CD40hu") y presentan actividad agonista. Se proporcionan secuencias para diversos anticuerpos monoclonales anti-CD40hu murinos humanizados. En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en la presente memoria se derivan de secuencias de línea germinal de cadenas pesadas y ligeras murinas particulares y/o comprenden características estructurales particulares tales como regiones de CDR que comprenden secuencias de aminoácidos particulares.

En la presente memoria se describen además métodos de fabricación de dichos anticuerpos, inmunoconjugados y moléculas biespecíficas que comprenden tales anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y composiciones farmacéuticas formuladas para contener los anticuerpos o fragmentos. También se proporcionan en la presente memoria métodos para utilizar los anticuerpos para mejorar la respuesta inmunitaria, solos o en combinación con otros agentes inmunoestimulantes (p. ej., anticuerpos) y/o terapias contra el cáncer o antiinfecciosas. De acuerdo con lo anterior, los anticuerpos anti-CD40hu descritos en la presente memoria se pueden utilizar en un tratamiento en una amplia variedad de aplicaciones terapéuticas, incluyendo, por ejemplo, la inhibición del crecimiento tumoral y el tratamiento de infecciones víricas crónicas.

Definiciones

Para que la presente descripción pueda entenderse más fácilmente, se definen primero determinados términos. Se establecen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

CD40 se refiere al "miembro 5 de la superfamilia de receptores de TNF" (TNFRSF5, por sus siglas en inglés). A menos que se indique lo contrario, o que resulte evidente a partir del contexto, las referencias a CD40 en la presente memoria se refieren a CD40 humano ("CD40hu"), y los anticuerpos anti-CD40 se refieren a anticuerpos anti-CD40 humanos. El CD40 humano se describe con mayor detalle en GENE ID n.º 958 y MIM (en inglés, "Mendelian Inheritance in Man"): 109535. La secuencia de CD40 humano (NP_001241.1), incluyendo la secuencia de señal de 20 aminoácidos, se proporciona en SEC ID n.º 11.

CD40 interactúa con el ligando de CD40 (CD40L), que también se conoce como TNFSF5, gp39 y CD154. A menos que se indique lo contrario, o que resulte evidente a partir del contexto, las referencias a CD40L en la presente memoria

se refieren a CD40L humano ("CD40hUL"). El CD40L humano se describe con mayor detalle en GENE ID n.º 959 y MIM. 300386. La secuencia de CD40L humano (NP_000065.1) se proporciona en SEC ID n.º 12.

A menos que se indique lo contrario o resulte evidente a partir del contexto, el término "anticuerpo" tal como se utiliza en la presente memoria puede incluir anticuerpos enteros y cualesquiera fragmentos de unión a antígeno (es decir, "porciones de unión a antígeno") o cadenas individuales de los mismos. Un "anticuerpo" se refiere, en una realización, a una glicoproteína que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces de disulfuro, o un fragmento de unión a antígeno de las mismas. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en lo sucesivo como V_H) y una región constante de cadena pesada. En determinados anticuerpos IgG, IgD e IgA naturales, la región constante de cadena pesada comprende tres dominios: CH1, CH2 y CH3. En determinados anticuerpos naturales, cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente memoria como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio, C_L . Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR, por sus siglas en inglés). Cada V_H y V_L se compone de tres CDR y cuatro regiones marco (FR), dispuestos de extremo aminoterminal a extremo carboxiterminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (p. ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

Los anticuerpos suelen unirse específicamente a su antígeno cognado con alta afinidad, reflejada por una constante de disociación (K_D) de entre 10^{-7} y 10^{-11} M o menos. Cualquier K_D mayor que aproximadamente 10^{-6} M generalmente se considera que indica unión no específica. Tal como se utiliza en la presente memoria, un anticuerpo que "se une específicamente" a un antígeno se refiere a un anticuerpo que se une al antígeno y a antígenos sustancialmente idénticos con alta afinidad, lo que significa presentar una K_D de 10^{-7} M o menor, preferentemente 10^{-8} M o menor, incluso más preferentemente 5×10^{-9} M o menor, y preferentemente de entre 10^{-8} M y 10^{-10} M o menor, aunque no se une con alta afinidad a antígenos no relacionados. Un antígeno es "sustancialmente idéntico" a un antígeno dado si muestra un alto grado de identidad de secuencia respecto al antígeno dado, por ejemplo, si muestra una identidad de por lo menos 80 %, por lo menos 90 %, preferentemente por lo menos 95 %, más preferentemente por lo menos 97 %, o todavía más preferentemente por lo menos 99 % de identidad respecto a la secuencia del antígeno dado. A modo de ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a CD40 humano también podría reaccionar cruzadamente con CD40 de determinadas especies de primates no humanos (p. ej., mono *Cynomolgus*), aunque podría no reaccionar cruzadamente con CD40 de otras especies, o con un antígeno distinto de CD40.

A menos que se indique lo contrario, una inmunoglobulina puede ser de cualquiera de los isotipos comúnmente conocidos, incluyendo, aunque sin limitación, IgA, IgA secretora, IgG e IgM. El isotipo de IgG se divide en subclases en determinadas especies: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 en seres humanos, e IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 en ratones. Las inmunoglobulinas, p. ej., IgG1 humana, existen en varios alotipos, que difieren entre sí en como máximo unos pocos aminoácidos. A menos que se indique lo contrario, "anticuerpo" puede incluir, a modo de ejemplo, anticuerpos monoclonales y policlonales; anticuerpos quiméricos y humanizados; anticuerpos humanos y no humanos; anticuerpos totalmente sintéticos; y anticuerpos de cadena sencilla.

La expresión "porción de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (p. ej., CD40 humano). Entre los ejemplos de fragmentos de unión comprendidos dentro de la expresión "porción/fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo se incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y CH1; ii) un fragmento de $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región bisagra; iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, y (v) un fragmento dAb (Ward et al. (1989) *Nature* 341:544-546) que consiste en un dominio V_H . Una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, o una combinación de dos o más CDR aislados unidos mediante un conector sintético, puede comprender un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo si es capaz de unirse al antígeno.

Los constructos de anticuerpo de cadena sencilla también están incluidos en la invención. Aunque los dos dominios del fragmento de Fv, V_L y V_H están codificados por genes separados, se pueden unir mediante métodos recombinantes mediante un conector sintético que les permite ser producidos como una sola cadena de proteína en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); ver, p. ej., Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426 y Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85:5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena sencilla también se pretende que estén comprendidos dentro de la expresión "porción/fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos y otros constructos potenciales se describen en Chan y Carter (2010) *Nat. Rev. Immunol.* 10:301. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por el experto en la materia, y los fragmentos se criban para su utilidad de la misma manera

que los anticuerpos intactos. Las porciones/fragmentos de unión a antígeno pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante, o mediante corte enzimático o químico de inmunoglobulinas intactas.

A menos que se indique lo contrario, el término "fragmento" cuando se usa en referencia a un anticuerpo, tal como en una reivindicación, se refiere a un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo, de tal manera que "anticuerpo o fragmento" presenta el mismo significado que "anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo".

Un "anticuerpo biespecífico" o "bifuncional" es un anticuerpo híbrido artificial que presenta dos pares diferentes de cadenas pesadas/ligeras, dando lugar a dos sitios de unión a antígeno con especificidad para diferentes antígenos. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante una variedad de métodos, incluyendo la fusión de hibridomas o la unión de fragmentos Fab'. Ver, p. ej., Songsivilai y Lachmann (1990) Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; Kostelny et al. (1992), J. Immunol. 148, 1547-1553.

La expresión "anticuerpo monoclonal", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo que muestra una única especificidad de unión y afinidad para un epítipo particular o una composición de anticuerpos en la que todos los anticuerpos muestran una única especificidad de unión y afinidad para un epítipo particular. Típicamente, dichos anticuerpos monoclonales se obtendrán de una sola célula o ácido nucleico codificante del anticuerpo, y se propagarán sin introducir deliberadamente ninguna alteración de la secuencia. De acuerdo con lo anterior, la expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a un anticuerpo monoclonal que presenta regiones variables y opcionales constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un hibridoma, por ejemplo, obtenido mediante la fusión de una célula B obtenida de un animal transgénico o transcromosómico no humano (p. ej., un ratón transgénico que presenta un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humano y un transgén de cadena ligera), a una célula inmortalizada.

La expresión "anticuerpo humano recombinante", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (p. ej., un ratón) que es transgénico o transcromosómico para los genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de ellos, (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, p. ej., de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos recombinantes combinatorios, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes que comprenden regiones variables y constantes que utilizan secuencias particulares de inmunoglobulina de línea germinal humana están codificadas por los genes de la línea germinal, aunque incluyen reordenamientos y mutaciones posteriores que ocurren, por ejemplo, durante la maduración del anticuerpo. Tal como se conoce de la técnica (ver, p. ej., Lonberg (2005) Nature Biotech. 23(9):1117-1125), la región variable contiene el dominio de unión a antígeno, que está codificado por diversos genes que se reorganizan para formar un anticuerpo específico para un antígeno foráneo. Además del reordenamiento, la región variable puede ser modificada adicionalmente por múltiples cambios de aminoácidos únicos (denominados mutación somática o hipermutación) para aumentar la afinidad del anticuerpo para el antígeno foráneo. La región constante cambiará en respuesta adicional a un antígeno (es decir, cambio de isotipo). Por lo tanto, las secuencias de ácido nucleico reorganizadas y somáticamente mutadas codificantes de los polipéptidos de inmunoglobulina de cadena ligera y cadena pesada en respuesta a un antígeno pueden no ser idénticas a las secuencias de línea germinal originales, sino que serán sustancialmente idénticas o similares (es decir, presentarán una identidad de por lo menos 80 %).

Un anticuerpo "humano" (mAb_hu) se refiere a un anticuerpo que presenta regiones variables en las que tanto el marco como las regiones CDR proceden de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también procede de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la presente invención pueden incluir residuos aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (p. ej., mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en la presente memoria, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como el ratón, han sido injertadas en secuencias de marco humanas. Los términos "humano" y "totalmente humano" referidos a anticuerpos e usan como sinónimos.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo en el que algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de los dominios CDR de un anticuerpo no humano, p. ej., un anticuerpo de ratón, han sido sustituidos por los aminoácidos correspondientes derivados de inmunoglobulinas humanas. En una realización de una forma humanizada de un anticuerpo, algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de los dominios CDR han sido sustituidos por aminoácidos de inmunoglobulinas humanas, mientras que algunos, la mayoría o todos los aminoácidos dentro de una o más regiones CDR se mantienen sin cambios. Pequeñas adiciones, deleciones, inserciones, sustituciones o modificaciones de aminoácidos son permisibles siempre y cuando no anulen la capacidad del anticuerpo para unirse a un antígeno en particular. Un anticuerpo "humanizado" conserva una especificidad antigénica similar a la del anticuerpo original.

Un "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que las regiones variables se derivan de una especie y las regiones constantes se derivan de otra especie, tal como un anticuerpo en el que las regiones variables se derivan de un anticuerpo de ratón y las regiones constantes se derivan de un anticuerpo humano. Un anticuerpo "híbrido" se refiere a un anticuerpo que presenta cadenas pesadas y ligeras de diferentes tipos, tal como una cadena pesada de ratón (parental) y una cadena ligera humanizada, o viceversa.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpos (p. ej., anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE) que está codificado por los genes de región constante de cadena pesada.

El término "alotipo" se refiere a variantes naturales dentro de un grupo de isotipo específico, cuyas variantes difieren en uno o algunos aminoácidos. Ver, p. ej., Jefferis et al. (2009) mAbs 1:1.

Las expresiones "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan indistintamente en la presente memoria con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

Un "anticuerpo aislado", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que presentan diferentes especificidades antigénicas (p. ej., un anticuerpo aislado que se une específicamente a CD40 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de CD40). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo de CD40 puede presentar reactividad cruzada con otras proteínas CD40 de diferentes especies.

Entre las "funciones efectoras", derivadas de la interacción de una región Fc de anticuerpo con determinados receptores de Fc, se incluyen, aunque sin limitarse necesariamente a ellas, la unión a Clq, la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la unión al receptor de Fc, funciones efectoras mediadas por FcγR, tales como la ADCC y la fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCP, por sus siglas en inglés), y la regulación negativa de un receptor de superficie celular (p. ej., el receptor de células B; BCR, por sus sigla en inglés). Tales funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión a antígeno (p. ej., un dominio variable de anticuerpo).

Un "receptor de Fc" o "FcR" es un receptor que se une a la región Fc de una inmunoglobulina. Los FcR que se unen a un anticuerpo IgG comprenden receptores de la familia de FcγR, incluyendo variantes alélicas y formas de procesamiento alternativo de estos receptores. La familia de FcγR consiste en tres receptores activadores (FcγRI, FcγRII y FcγRIII en ratones; FcγRIA, FcγRIIA y FcγRIIIA en seres humanos) y un receptor inhibitorio (FcγRIIb, o equivalentemente, FcγRIIB). Se resumen diversas propiedades de los FcγRs humanos en la Tabla 1. La mayoría de los tipos de células efectoras innatas coexpresan uno o más FcγR activadores y FcγRIIb inhibitorio, mientras que las células asesinas naturales (NK) expresan selectivamente un receptor de Fc activador (FcγRIII en ratones y FcγRIIIA en seres humanos) pero no FcγRIIb inhibitorio en ratones y seres humanos. La IgG1 humana se une a la mayoría de los receptores de Fc humanos y se considera equivalente a la IgG2a murina con respecto a los tipos de receptores de Fc activadores a los que se une.

TABLA 1

Propiedades de los FcγR humanos				
Fcγ	Variantes alélicas	Afinidad para el IgG humano	Preferencia de isotipo	Distribución celular
FcγRI	Ninguna descrita	Alta ($K_D \sim 10$ nM)	IgG1>3>4>>2	¿Monocitos, macrófagos, neutrófilos activados, células dendríticas?
FcγRIIA	H131	Baja a intermedia	IgG1>3>2>4	Neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos, células dendríticas, plaquetas
	R131	Baja	IgG1>3>4>2	
FcγRIIIA	V158	Intermedia	IgG1=3>>4>2	¿Células NK, monocitos, macrófagos, mastocitos, eosinófilos, células dendríticas?
	F158	Baja	IgG1=3>>4>2	
FcγRIIb	I232	Baja	IgG1 =3=4>2	Células B, monocitos, macrófagos, células dendríticas, mastocitos
	T232	Baja	IgG1 =3=4>2	

Una "región FC" (región de fragmento cristizable), "dominio Fc" o "Fc" se refiere a la región C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que actúa como mediador en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, incluida la unión a los receptores de Fc ubicados en diversas células del sistema inmunitario (p. ej., células efectoras) o al primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. Por lo tanto, una región Fc comprende la región constante de un anticuerpo, excluyendo el dominio de inmunoglobulina de la primera región constante (p. ej., CH1 o CL). En isotipos de anticuerpo IgG, IgA e IgD, la región Fc comprende los dominios constantes CH2 y CH3 en cada una de las dos cadenas pesadas del anticuerpo; las regiones Fc de IgM e IgE comprenden tres dominios constantes

de cadena pesada (dominios CH 2 a 4) en cada cadena polipeptídica. Para IgG, la región Fc comprende los dominios de inmunoglobulina Cy2 y Cy3 y la bisagra entre Cy1 y Cy2. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define que generalmente abarca desde un residuo aminoácido en la posición C226 o P230 (o un aminoácido entre estos dos aminoácidos) hasta el extremo carboxiterminal de la cadena pesada, donde la numeración es según el índice UE, tal como en Kabat. Kabat et al. (1991) *Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico*, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD ;ver también las figuras 3c-3f de la solicitud publicada de patente US n.º 2008/0248028. El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana se extiende desde aproximadamente el aminoácido 231 hasta aproximadamente el aminoácido 340, mientras que el dominio CH3 está situado en el lado C-terminal de un dominio CH2 en una región Fc, es decir, se extiende desde aproximadamente el aminoácido 341 hasta aproximadamente el aminoácido 447 de la IgG (incluyendo una lisina C-terminal). Tal como se utiliza en la presente memoria, la región Fc puede ser una Fc de secuencia nativa, que incluye cualquier variante alotípica, o una Fc variante (p. ej., una Fc no natural). La Fc también puede referirse a esta región en forma aislada o en el contexto de un polipéptido de proteína que comprende la Fc, tal como una "proteína de unión que comprende una región Fc", también conocida como "proteína de fusión de Fc" (p. ej., un anticuerpo o inmunoadhesina).

Una "región Fc de secuencia nativa" o "Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa incluyen una región Fc de IgG1 humana de secuencia nativa; una región Fc de IgG2 humana de secuencia nativa; una región Fc de IgG3 humana de secuencia nativa y una región Fc de IgG4 humana de secuencia nativa, así como variantes naturales de las mismas. La Fc de secuencia nativa incluye los diversos alotipos de las Fc. Ver, p. ej., Jefferis et al. (2009) *mAbs* 1:1.

El término "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio en un antígeno (p. ej., CD40hu) al que se une específicamente una inmunoglobulina o un anticuerpo. Los epítipos dentro de los antígenos proteicos pueden estar formados tanto de aminoácidos contiguos (generalmente un epítipo lineal) como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de la proteína (generalmente un epítipo conformacional). Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos habitualmente, aunque no siempre, resultan retenidos al exponerlos a solventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario normalmente se pierden al tratarlos con solventes desnaturizantes. Un epítipo normalmente incluye por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única.

La expresión "mapeo del epítipo" se refiere al procedimiento de identificación de los determinantes moleculares en el antígeno involucrados en el reconocimiento anticuerpo-antígeno. Los métodos para determinar qué epítipos se unen a un anticuerpo dado son bien conocidos de la técnica y entre ellos se incluyen, por ejemplo, los ensayos de inmunotransferencia e inmunoprecipitación, en los que péptidos superpuestos o contiguos de (p. ej., de CD40) se analizan para la reactividad con un anticuerpo dado (p. ej., el anticuerpo anti-CD40), la cristalografía de rayos X, la resonancia magnética nuclear bidimensional, la exposición en levaduras, y HDX-MS (ver, p. ej., *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

La expresión "se une al mismo epítipo" en referencia a dos o más anticuerpos se refiere a que los anticuerpos se unen al mismo segmento de residuos aminoácidos, según lo determinado mediante un método dado. Entre las técnicas para determinar si los anticuerpos se unen al "mismo epítipo en CD40" con los anticuerpos descritos en la presente memoria se incluyen, por ejemplo, los métodos de mapeo del epítipo, tales como el análisis de rayos X de cristales de complejos de antígeno:anticuerpo, que proporcionan resolución atómica del epítipo, y la espectrometría de masas de intercambio hidrógeno/deuterio (HDX-MS, por sus siglas en inglés). Otros métodos realizan un seguimiento de la unión del anticuerpo a fragmentos de antígeno (p. ej., fragmentos proteolíticos) o a variaciones mutadas del antígeno en las que la pérdida de unión debido a una modificación de un residuo aminoácido dentro de la secuencia del antígeno se considera frecuentemente una indicación de un componente epítipo, tal como la mutagénesis por barrido de alanina (Cunningham y Wells (1985) *Science* 244:1081) o la exposición en levaduras de variantes mutantes de secuencia diana. Además, también se pueden utilizar métodos combinatorios computacionales para el mapeo de epítipos. Estos métodos se basan en la capacidad del anticuerpo de interés para aislar por afinidad péptidos cortos específicos a partir de las bibliotecas combinatorias de péptidos de exposición fágica. Se espera que los anticuerpos que presentan V_L y V_H iguales o estrechamente relacionadas o las mismas secuencias CDR, se unan al mismo epítipo.

Los anticuerpos que "compiten con otro anticuerpo por la unión a una diana" se refieren a anticuerpos que inhiben (parcial o completamente) la unión del otro anticuerpo a la diana. Si dos anticuerpos compiten entre sí para la unión a una diana, es decir, si un anticuerpo inhibe la unión del otro anticuerpo a una diana, y en qué medida, puede determinarse mediante experimentos conocidos de competición. En determinadas realizaciones, un anticuerpo compite con, e inhibe la unión de otro anticuerpo a una diana en por lo menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %. El nivel de inhibición o competición puede ser diferente dependiendo de qué anticuerpo es el "anticuerpo bloqueante" (es decir, el anticuerpo frío que se incubó en primer lugar con la diana). Los ensayos de competición se pueden llevar a cabo tal como se ha descrito en, por ejemplo, Ed Harlow y David Lane, *Cold Spring Harb. Protoc.*; 2006; doi: 10.1101/pdb.prot42770 en el capítulo 11 de "Using Antibodies" por Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, EE. UU., 1999. Los anticuerpos competidores se unen al mismo epítipo, un epítipo superpuesto o a epítipos contiguos (p. ej., como lo demuestra el impedimento estérico).

Entre otros ensayos de unión competitiva se incluyen: el radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés) directo o indirecto en fase sólida, el inmunoensayo enzimático (EIA, por sus siglas en inglés) directo o indirecto en fase sólida y el ensayo de competición tipo sándwich (ver Stahli et al. (1983) *Methods in Enzymology* 9:242); el EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (ver Kirkland et al. (1986) *J. Immunol.* 137:3614); el ensayo de marcaje directo en fase sólida, el ensayo de marcaje directo tipo sándwich (ver Harlow y Lane (1988), *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); el RIA de marcaje directo en fase sólida utilizando el marcaje I-125 (ver Morel et al. (1988) *Mol. Immunol.* 25(1):7); el EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (Cheung et al. (1990) *Virology* 176:546), y el RIA de marcaje directo. (Moldenhauer et al. (1990) *Scand. J. Immunol.* 32:77.

Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "unión específica", "unión selectiva", "se une selectivamente" y "se une específicamente" se refieren a la unión de anticuerpos a un epítipo en un antígeno predeterminado, aunque no a otros antígenos. Normalmente, el anticuerpo (i) se une a una constante de disociación de equilibrio (K_D) aproximadamente menor a 10^{-7} M, tal como aproximadamente menor a 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso menor cuando se determina mediante, p. ej., tecnología de resonancia del plasmón superficial (SPR) en un instrumento de resonancia del plasmón superficial BIACORE®2000 utilizando el antígeno predeterminado, p. ej., CD40 humano recombinante, como el analito y el anticuerpo como el ligando, o análisis de Scatchard de la unión del anticuerpo a células positivas para el antígeno, y (ii) se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es por lo menos dos veces mayor que su afinidad para la unión a un antígeno no específico (p. ej., BSA o caseína) que no sea el antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. En consecuencia, un anticuerpo que "se une específicamente a CD40 humano" se refiere a un anticuerpo que se une a CD40 humano soluble o unido a células con una K_D de 10^{-7} M o inferior, tal como aproximadamente menor a 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso menor. Un anticuerpo que "reacciona cruzadamente con CD40 de *Cynomolgus*" se refiere a un anticuerpo que se une a CD40 de *Cynomolgus* con una K_D de 10^{-7} M o menor, tal como aproximadamente menor a 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso menor.

El término " k_{asoc} " o " K_A ", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la constante de tasa de asociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno, mientras que el término " k_{dis} " o " K_D ", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la constante de tasa de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno. El término " K_D ", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la constante de disociación de equilibrio, que se obtiene de la proporción K_D a K_A (es decir, K_D/K_A) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de K_D para anticuerpos se pueden determinar utilizando métodos bien establecidos en la técnica. Un método preferente para determinar la K_D de un anticuerpo es el análisis por interferometría de biocapa (BLI, por sus siglas en inglés), preferentemente utilizando un dispositivo ForteBio Octet RED, resonancia de plasmón superficial, preferentemente utilizando un sistema de biosensor, tal como un sistema de resonancia del plasmón superficial BIACORE® (ver el Ejemplo 5), o citometría de flujo y análisis de Scatchard.

El término " EC_{50} " en el contexto de un ensayo *in vitro* o *in vivo* que utiliza un anticuerpo o fragmento de unión de antígeno al mismo, se refiere a la concentración de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que induce una respuesta que es 50 % de la respuesta máxima, es decir, a medio camino entre la respuesta máxima y la línea de base.

La expresión "se une a CD40 inmovilizado" se refiere a la capacidad de un anticuerpo descrito en la presente memoria para unirse a CD40, por ejemplo, expresado sobre la superficie de una célula o unido a un soporte sólido.

La expresión "reacciona cruzadamente", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la capacidad de un anticuerpo descrito en la presente memoria para unirse a CD40 de una especie diferente. Por ejemplo, un anticuerpo descrito en la presente memoria que se une al CD40 humano también puede unirse a CD40 de otra especie (p. ej., CD40 de *Cynomolgus*). Tal como se utiliza en la presente memoria, la reactividad cruzada puede medirse mediante la detección de una reactividad específica con antígeno purificado en ensayos de unión (p. ej., SPR o ELISA) o de unión, o alternativamente de interacción funcional con células que expresan fisiológicamente CD40. Entre los métodos para determinar la reactividad cruzada se incluyen ensayos de unión estándares tal como se describe en la presente memoria, por ejemplo, mediante el análisis de resonancia del plasmón superficial (SPR) BIACORE® utilizando un instrumento de SPR BIACORE®2000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia), o técnicas de citometría de flujo.

El término "natural" tal como se utiliza en la presente memoria aplicado a un objeto se refiere al hecho de que puede encontrarse un objeto en la naturaleza. Por ejemplo, un polipéptido o una secuencia polipeptídica que está presente en un organismo (incluidos los virus) y que puede aislarse a partir de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificado deliberadamente por el hombre en el laboratorio es natural.

Un "polipéptido" se refiere a una cadena que comprende por lo menos dos residuos aminoácidos unidos consecutivamente, sin límite superior de longitud de la cadena. Uno o más residuos aminoácidos en la proteína pueden contener una modificación, tal como, aunque sin limitación, glicosilación, fosforilación o un enlace disulfuro. Una "proteína" puede comprender uno o más polipéptidos.

La expresión "molécula de ácido nucleico", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir moléculas de

ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o de doble cadena, y puede ser ADNc.

También se proporcionan "modificaciones de secuencia conservadoras" a la secuencia de anticuerpo proporcionada en la presente memoria, es decir, modificaciones de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos que no anulen la unión del anticuerpo codificado por la secuencia de nucleótidos o que contiene la secuencia de aminoácidos, al antígeno. Por ejemplo, pueden introducirse modificaciones mediante técnicas estándares conocidas de la técnica, tales como la mutagénesis dirigida al sitio y la mutagénesis mediada por PCR. Entre las modificaciones conservadoras de secuencia se incluyen sustituciones conservadoras de aminoácidos, en las que el residuo aminoácido se sustituye por un residuo aminoácido que presenta una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de residuos aminoácidos que presentan cadenas laterales similares. Entre estas familias se incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina e histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico y ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína y triptófano), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina y metionina), cadenas laterales con ramificación beta (p. ej., treonina, valina e isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano e histidina). Por lo tanto, un residuo aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo anti-CD40 se sustituye preferentemente por otro residuo aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. Los métodos para identificar sustituciones conservadoras de nucleótidos y aminoácidos que no eliminan la unión a antígeno son bien conocidos de la técnica. Ver, p. ej., Brummell et al. (1993) *Biochem.* 32:1180-1187; Kobayashi et al. (1999) *Protein Eng.* 12(10):879-884 y Burks et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:412-417.

Alternativamente, en otra realización, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de la totalidad o parte de una secuencia codificante de anticuerpos anti-CD40, tal como mediante mutagénesis de saturación, y los anticuerpos anti-CD40 modificados resultantes pueden cribarse para una actividad de unión mejorada.

Para los ácidos nucleicos, la expresión "homología sustancial" indica que dos ácidos nucleicos, o secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean óptimamente y se comparan, son idénticos, con inserciones o deleciones apropiadas de nucleótidos, en por lo menos aproximadamente 80 % de los nucleótidos, generalmente por lo menos aproximadamente 90 % a 95 %, y más preferentemente por lo menos entre 98 % y 99,5 % de los nucleótidos. Alternativamente, existe una homología sustancial cuando los segmentos se hibridan bajo condiciones de hibridación selectiva, al complemento de la cadena.

Para los polipéptidos, la expresión "homología sustancial" indica que dos polipéptidos, o secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean y comparan óptimamente, son idénticos, con inserciones o deleciones apropiadas de aminoácidos, en por lo menos aproximadamente 80 % de los aminoácidos, generalmente por lo menos aproximadamente 90 % a 95 %, y más preferentemente por lo menos aproximadamente 98 % a 99,5 % de los aminoácidos.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias cuando las secuencias están alineadas óptimamente (es decir, % de homología = $(n.^{\circ} \text{ de posiciones idénticas} / n.^{\circ} \text{ total de posiciones}) \times 100$), con una alineación óptima determinada que considera el número de huecos y la longitud de cada hueco, que deben introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación entre secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede llevar a cabo utilizando un algoritmo matemático, tal como se describe en los ejemplos no limitativos, posteriormente.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar utilizando el programa GAP en el paquete de software GCG, utilizando un NWSgapdna con matriz CMP y una ponderación de hueco de 40, 50, 60, 70 o 80 y una ponderación de la longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos también se puede determinar utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)) que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de ponderaciones de residuos PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch ((1970) *J. Mol. Biol.* (48):444-453), que se ha incorporado al programa GAP en el paquete informático GCG, utilizando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y una ponderación por hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y una ponderación por longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas descritas en la presente memoria pueden utilizarse además como una "secuencia de consulta" para llevar a cabo una búsqueda en bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Estas búsquedas se pueden llevar a cabo utilizando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Las búsquedas de nucleótidos de BLAST pueden llevarse a cabo con el programa NBLAST, puntuación=100, longitud de palabra=12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria. Las búsquedas de proteínas de BLAST pueden llevarse a cabo con el programa XBLAST, puntuación=50, longitud de palabra=3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína descritas en la presente memoria. Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, se puede utilizar BLAST con huecos (en inglés "Gapped BLAST") tal como se describe en Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los

programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros por defecto de los programas respectivos (p. ej., XBLAST y NBLAST).

Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico ha sido "aislado" o "convertido en sustancialmente puro" cuando se ha purificado respecto a otros componentes celulares u otros contaminantes, p. ej., otros ácidos nucleicos celulares (p. ej., las otras partes del cromosoma) o proteínas, mediante técnicas estándar, incluido el tratamiento alcalino/SDS, bandas CsCl, cromatografía de columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos de la técnica. Ver F. Ausubel, et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

El término "vector", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN circular de doble cadena en el que se pueden ligar segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que pueden ligarse segmentos adicionales de ADN al genoma vírico. Determinados vectores son capaces de replicarse autónomamente en una célula huésped en la que se introducen (p. ej., vectores bacterianos que presentan un origen bacteriano de replicación y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (p. ej., vectores no episómicos de mamífero) pueden integrarse en el genoma de la célula huésped al introducirse en la célula huésped, y de esta manera, se replican junto con el genoma huésped. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están operablemente ligados. Dichos vectores se denominan en la presente memoria "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante con frecuencia presentan la forma de plásmido. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente utilizada. Sin embargo, también se incluyen otras formas de vectores de expresión, tales como los vectores víricos (p. ej., retrovirus defectuosos en replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que cumplen funciones equivalentes.

La expresión "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), tal como se utiliza en la presente memoria, pretende referirse a una célula que comprende un ácido nucleico que no está presente naturalmente en la célula, y puede ser una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que tales términos pretenden referirse no solo particularmente a la célula en cuestión, sino a la progenie de dicha célula. Debido a que determinadas modificaciones pueden ocurrir en generaciones sucesivas debido a mutación o a influencias medioambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero todavía se encuentran incluidas dentro del alcance de la expresión "célula huésped" tal como se utiliza en la presente memoria.

Una "respuesta inmunitaria" se refiere a una respuesta biológica dentro de un vertebrado contra agentes foráneos, cuya respuesta protege al organismo contra estos agentes y enfermedades causadas por ellos. Una respuesta inmunitaria está mediada por la acción de una célula del sistema inmunitario (por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B, células asesinas naturales (NK), macrófagos, eosinófilos, mastocitos, células dendríticas o neutrófilos) y macromoléculas solubles producidas por cualquiera de estas células o el hígado (incluyendo anticuerpos, citoquinas, y el complemento) que resulte en la selección, unión, daño, destrucción y/o eliminación en el cuerpo del vertebrado de los patógenos invasores, y células o tejidos infectados por patógenos, células cancerosas u otras células anormales, o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales. Una reacción inmune incluye, p. ej., la activación o inhibición de una célula T, p. ej., una célula T efectora o una célula Th, tal como una célula T CD4⁺ o CD8⁺, o la inhibición o agotamiento de una célula T_{reg}. Las células "T efectoras" (T_{eff}) se refieren a las células T (p. ej., células T CD4⁺ y CD8⁺) con actividades citolíticas, así como las células T ayudantes (Th), que secretan citoquinas y activan y dirigen otras células inmunitarias, pero no incluyen las células T reguladoras (células T_{reg}).

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "respuesta mediada por células T" se refiere a una respuesta mediada por células T, incluyendo células T efectoras (p. ej., células CD8⁺) y células T ayudantes (p. ej., células CD4⁺). Entre las respuestas mediadas por células T se incluyen, por ejemplo, la citotoxicidad y proliferación de células T.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL)" se refiere a una respuesta inmunitaria inducida por células T citotóxicas (CTL, por sus siglas en inglés). Las respuestas de CTL están mediadas principalmente por las células T CD8⁺.

Un "inmunomodulador" o "inmunorregulador" se refiere a un agente, p. ej., un componente de una vía de señalización que puede estar involucrado en la modulación, regulación o modificación de una respuesta inmunitaria. Los términos "modulando", "regulando" o "modificando" una respuesta inmunitaria se refieren a cualquier alteración en una célula del sistema inmunitario o en la actividad de dicha célula (p. ej., una célula T efectora). Dicha modulación incluye la estimulación o supresión del sistema inmunitario que puede manifestarse como un aumento o disminución en el número de diversos tipos de células, un aumento o disminución en la actividad de estas células, o cualesquiera otros cambios que pueden ocurrir dentro del sistema inmunitario. Se han identificado inmunomoduladores inhibitorios y estimuladores, algunos de los cuales pueden presentar una función mejorada en un microambiente tumoral. En realizaciones preferentes, el inmunomodulador se encuentra sobre la superficie de una célula T. Una "diana

inmunomoduladora" o "diana inmunorreguladora" es un inmunomodulador que es la diana de unión de una sustancia, agente, grupo, compuesto o molécula, y cuya actividad resulta alterada por la unión de una sustancia, agente, fracción, compuesto o molécula. Entre las dianas inmunomoduladoras se incluyen, por ejemplo, receptores sobre la superficie de una célula ("receptores inmunomoduladores") y ligandos de receptores ("ligandos inmunomoduladores").

"Inmunoterapia" se refiere al tratamiento de un sujeto que sufre o corre el riesgo de contraer o sufrir una recurrencia de una enfermedad mediante un método que comprende inducir, mejorar, suprimir o modificar de otra manera una respuesta inmunitaria.

Las expresiones "terapia inmunoestimuladora" y "tratamiento inmunoestimulador" se refieren a una terapia que resulta en el incremento (inducción o potenciación) de una respuesta inmunitaria en un sujeto para, p. ej., tratamiento del cáncer.

"Potenciar una respuesta inmunitaria endógena" se refiere a incrementar la eficacia o potencia de una respuesta inmunitaria existente en un sujeto. Este incremento de la eficacia y potencia se puede conseguir, por ejemplo, mediante la superación de los mecanismos que suprimen la respuesta inmunitaria endógena del huésped o mediante la estimulación de mecanismos que mejoran la respuesta inmunitaria endógena del huésped.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "unidas" se refiere a la asociación de dos o más moléculas. El enlace puede ser covalente o no covalente. El enlace también puede ser genético (p. ej., fusionadas recombinantemente). Estos enlaces pueden conseguirse utilizando una amplia variedad de técnicas reconocidas, tales como la conjugación química y la producción de proteínas recombinantes.

tal como se utiliza en la presente memoria, "administrar" se refiere a la introducción física de una composición que comprende un agente terapéutico en un sujeto, utilizando cualquiera de los diversos métodos y sistemas de administración conocidos por el experto en la materia. Entre las vías de administración preferentes para los anticuerpos descritos en la presente memoria se incluyen las vías de administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, espinal u otras vías parenterales, por ejemplo, por inyección o infusión. La expresión "administración parenteral" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, generalmente por inyección, e incluye, aunque sin limitación, la administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, intratecal, intralinfática, intralesional, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraspinal, epidural e intraesternal, así como la electroporación *in vivo*. Alternativamente, un anticuerpo descrito en la presente memoria puede administrarse mediante vía no parenteral, tal como una vía tópica, epidérmica o mucosa de administración, por ejemplo, intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica. La administración también puede llevarse a cabo, por ejemplo, una vez, una pluralidad de tiempos, y/o durante uno o más períodos prolongados.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "inhibe" o "bloquea" se utilizan indistintamente y abarcan tanto la inhibición/bloqueo parcial como completo por lo menos en aproximadamente 50 %, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 %.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "cáncer" se refiere a un amplio grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento incontrolado de células anormales en el cuerpo. La división celular no regulada puede resultar en la formación de tumores malignos o células que invaden tejidos vecinos y pueden hacer metástasis a partes distantes del cuerpo a través del sistema linfático o el torrente sanguíneo.

Los términos "tratar", "tratando" y "tratamiento", tal como se utilizan en la presente memoria, se refieren a cualquier tipo de intervención o proceso realizado en el sujeto, o la administración de un agente activo al sujeto, con el objetivo de revertir, aliviar, mejorar, inhibir, retrasar o prevenir la progresión, desarrollo, gravedad o recurrencia de un síntoma, complicación, afección o indicios bioquímicos asociados a una enfermedad. La profilaxis se refiere a la administración a un sujeto que no tiene una enfermedad, a fin de evitar que la enfermedad ocurra o para minimizar sus efectos si lo hace.

La expresión "dosis eficaz" o "dosificación eficaz" se define como la cantidad suficiente para conseguir, o por lo menos parcialmente conseguir, un efecto deseado. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "dosis terapéuticamente eficaz" de un medicamento o agente terapéutico es cualquier cantidad del medicamento que, cuando se usa solo o en combinación con otro agente terapéutico, promueve la regresión de la enfermedad, puesta de manifiesto por una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los períodos libres de síntomas de la enfermedad, o una prevención de la discapacidad o deterioro debido a la enfermedad. Una "cantidad profilácticamente eficaz" o una "dosis profilácticamente eficaz" de un medicamento es una cantidad del medicamento que, cuando se administra sola o en combinación con otro agente terapéutico a un sujeto con riesgo de desarrollar una enfermedad o de sufrir una reaparición de la enfermedad, inhibe el desarrollo o la recurrencia de la enfermedad. La capacidad de un agente terapéutico o profiláctico para promover la regresión de la enfermedad o inhibir el desarrollo o la recurrencia de la enfermedad puede evaluarse utilizando una variedad de métodos conocidos por el experto en la materia, tal como en sujetos humanos durante ensayos clínicos, en sistemas de modelo animal predictivos de eficacia en seres humanos, o mediante el ensayo de la actividad del agente en ensayos *in vitro*.

A modo de ejemplo, un agente anticancerígeno es un medicamento que retarda la progresión del cáncer o promueve la regresión del cáncer en un sujeto. En realizaciones preferentes, una cantidad terapéuticamente efectiva del medicamento promueve la regresión del cáncer hasta el punto de eliminar el cáncer. La expresión "que promueve la regresión del cáncer" se refiere a que la administración de una cantidad eficaz del medicamento, solo o en combinación con un agente antineoplásico, da lugar a una reducción en el crecimiento o tamaño del tumor, a la necrosis del tumor, a una disminución de la gravedad de por lo menos un síntoma de la enfermedad, a un aumento de la frecuencia y la duración de los períodos libres de síntomas de la enfermedad, a la prevención de la discapacidad causada por la enfermedad, o de otra manera, la mejora de los síntomas de la enfermedad en el paciente. La eficacia farmacológica se refiere a la capacidad del medicamento de promover la regresión del cáncer en el paciente. La seguridad fisiológica se refiere a un nivel aceptablemente bajo de toxicidad, u otros efectos fisiológicos adversos a nivel celular, de órgano y/ de organismo (efectos adversos) resultantes de la administración del medicamento.

A modo de ejemplo para el tratamiento de tumores, una cantidad terapéuticamente eficaz o una dosis del medicamento inhibe preferentemente el crecimiento celular o el crecimiento tumoral en por lo menos aproximadamente 20 %, más preferentemente en por lo menos aproximadamente 40 %, incluso más preferentemente en por lo menos aproximadamente 60 %, y todavía más preferentemente en por lo menos aproximadamente 80 % respecto a los sujetos no tratados. En las realizaciones más preferentes, una cantidad o dosis terapéuticamente eficaz del medicamento inhibe completamente el crecimiento celular o el crecimiento tumoral, es decir, inhibe preferentemente el crecimiento celular o el crecimiento tumoral en 100 %. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento tumoral se puede evaluar utilizando los ensayos descritos posteriormente. La inhibición del crecimiento tumoral puede no ser inmediata después del tratamiento, y puede ocurrir solo después de un período de tiempo o después de la administración repetida. Alternativamente, esta propiedad de una composición se puede evaluar mediante examen de la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular, tal inhibición se puede medir *in vitro* mediante ensayos conocidos por el experto en la materia. En otras realizaciones preferentes descritas en la presente memoria, puede observarse regresión tumoral y puede continuar durante un período de por lo menos aproximadamente 20 días, más preferentemente por lo menos aproximadamente 40 días, o incluso más preferentemente por lo menos aproximadamente 60 días.

La terapia "combinada", tal como se utiliza en la presente memoria, a menos que se indique lo contrario a partir del contexto, pretende comprender la administración de dos o más agentes terapéuticos de manera coordinada, e incluye, aunque sin limitación, la administración simultánea. Específicamente, la terapia combinada comprende tanto la coadministración (p. ej., la administración de una coformulación o la administración simultánea de composiciones terapéuticas separadas) y la administración en serie o secuencial, siempre que la administración de un agente terapéutico esté condicionada de alguna manera a la administración de otro agente terapéutico. Por ejemplo, puede administrarse un agente terapéutico solo después de que se haya administrado un agente terapéutico diferente y se haya permitido actuar durante un período de tiempo prescrito. Ver, p. ej., Kohrt et al. (2011) Blood 117:2423.

Los términos "paciente" y "sujeto" se refieren a cualquier ser humano que recibe tratamiento profiláctico o terapéutico. Por ejemplo, los métodos y composiciones descritos en la presente memoria se pueden usar para tratar un sujeto que presenta cáncer.

Diversos aspectos descritos en la presente memoria se describen con mayor detalle en las siguientes subsecciones.

I. Anticuerpos anti-CD40

La presente solicitud da a conocer anticuerpos anti-CD40hu agonistas que presentan propiedades deseables para su uso como agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer. Estas propiedades incluyen una o más de la capacidad de unirse a CD40 humano con alta afinidad, una inmunogenicidad aceptablemente baja en sujetos humanos, la capacidad de unirse preferentemente a FcγRIIb, y la ausencia de problemas en la secuencia que puedan reducir la estabilidad química del anticuerpo.

Los anticuerpos anti-CD40 dados a conocer en la presente memoria por secuencia se unen a epítopos específicos en el CD40 humano. Otros anticuerpos que se unen a los mismos epítopos o a estrechamente relacionados probablemente compartirían estas propiedades deseables, y podrían ser identificados mediante experimentos de competición.

Anticuerpos anti-CD40hu que compiten con los anticuerpos anti-CD40hu dados a conocer en la presente memoria

Los anticuerpos anti-CD40hu que compiten con los anticuerpos de la presente invención para unirse a CD40hu pueden producirse utilizando protocolos de inmunización similares a los descritos en la presente memoria (Ejemplos 1 y 2). Los anticuerpos que compiten para la unión a los anticuerpos anti-CD40hu dados a conocer en la presente memoria por secuencia también pueden ser generados por ratones inmunizadores u otros animales no humanos con CD40 humano o un constructo que comprende el dominio extracelular del mismo (residuos 21 a 193 de SEC ID n.º 11), o mediante la inmunización con un fragmento de CD40 humano que contiene el epítipo al que se unen los anticuerpos anti-CD40hu dados a conocer en la presente memoria. Los anticuerpos resultantes pueden cribarse para la capacidad

de bloquear la unión de un anticuerpo que comprende una región de Fc mutante que presenta una o más mutaciones correspondientes a una o más mutaciones en una cadena pesada de IgG seleccionada del grupo que consiste en N297A, SE, SELF, V9, y/o V11 (SEC ID n.º 3 a n.º 7), a CD40 humano por métodos bien conocidos de la técnica, por ejemplo, bloqueando la unión a la proteína de fusión del dominio extracelular de CD40 y un dominio Fc de inmunoglobulina en un ELISA, o bloqueando la capacidad de unirse a las células que expresan CD40hu en su superficie, p. ej., mediante FACS. El anticuerpo de ensayo puede ponerse en contacto con la proteína de fusión CD40-Fc (o con células que expresan CD40hu en su superficie) antes, al mismo tiempo o después de la adición de un anticuerpo que comprende una región Fc mutante que presenta una o más mutaciones correspondientes a una o más mutaciones en una cadena pesada de IgG seleccionada del grupo que consiste en N297A, SE, SELF, V9 y/o V11 (SEC ID n.º 3 a n.º 7). Por ejemplo, se pueden realizar experimentos de clasificación (en inglés, "binning") para determinar si un anticuerpo de ensayo cae en la misma clase que los anticuerpos dados a conocer en la presente memoria por secuencia, con anticuerpos dados a conocer en la presente memoria por secuencia como los anticuerpos de "referencia" y los anticuerpos que se someterán a ensayo como los anticuerpos de "ensayo". Los anticuerpos que reducen la unión de los anticuerpos dados a conocer en la presente memoria por secuencia a CD40 humano (ya sea como una fusión de Fc o en una célula), particularmente a concentraciones aproximadamente estequiométricas, es probable que se unan a los mismos epítomos, o a epítomos superpuestos o contiguos, y de esta manera pueden compartir las propiedades funcionales deseables de un anticuerpo que comprende una región Fc mutante que presenta una o más mutaciones correspondientes a una o más mutaciones en una cadena pesada de IgG seleccionada del grupo que consiste en N297A, SE, SELF, V9 y/o V11 (SEC ID n.º 3 a n.º 7).

Un experimento de competición de ejemplo para determinar si un anticuerpo de ensayo bloquea la unión de un anticuerpo de referencia (es decir, si "compite"), puede llevarse a cabo de la siguiente manera: se siembran células que expresan CD40 a razón de 10^5 células por muestra en una placa de 96 pocillos. La placa se deja sobre hielo, seguido de la adición de anticuerpos de ensayo no conjugados en concentraciones comprendidas entre 0 y 50 µg/ml (titulación de tres veces partiendo de una concentración más alta de 50 µg/ml). Puede utilizarse una IgG no relacionada como control de isotipo para el primer anticuerpo y añadirse en las mismas concentraciones (titulación triple a partir de una concentración más alta de 50 µg/ml). Puede incluirse una muestra preincubada con 50 µg/ml de anticuerpo de referencia no marcado a modo de control positivo para el bloqueo completo (inhibición del 100 %) y puede utilizarse una muestra sin anticuerpo en la incubación primaria como control negativo (sin competición; inhibición del 0 %). Después de 30 minutos de incubación, marcaje, p. ej., biotilación, el anticuerpo de referencia se añade a una concentración de 2 µg/ml por pocillo sin lavado. Las muestras se incubaron durante 30 minutos adicionales sobre hielo. Los anticuerpos no unidos se eliminaron mediante lavado de las células con tampón de FACS. El anticuerpo de referencia marcado unido a células se detectó con un agente que detecta el marcaje, p. ej., estreptavidina conjugada con PE (Invitrogen, n.º de catálogo S21388) para la detección de biotina. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD, San José) y se analizaron con el software Flowjo (Tree Star, Inc, Ashland, OR). Los resultados pueden representarse como el % de inhibición (es decir, restando del 100 % la cantidad de marcaje a cada concentración dividida por la cantidad de marcaje obtenida sin anticuerpo bloqueante).

Normalmente, a continuación se lleva a cabo el mismo experimento a la inversa, es decir, el anticuerpo de ensayo es el anticuerpo de referencia y el anticuerpo de referencia es el anticuerpo de ensayo. Un anticuerpo de referencia y un anticuerpo de ensayo "bloquean cruzadamente" la unión entre ellos cuando los anticuerpos compiten entre sí en ambos sentidos, es decir, en experimentos de competición en los que se añade primero el anticuerpo de referencia y en experimentos de competición en los que se añade primero el anticuerpo de ensayo.

Anticuerpos anti-CD40hu que se unen al mismo epítomo

Los anticuerpos anti-CD40hu que se unen a los mismos epítomos o a epítomos similares a los anticuerpos dados a conocer en la presente memoria pueden producirse usando protocolos de inmunización similares a los descritos en la presente memoria. Los anticuerpos resultantes pueden cribarse para alta afinidad de unión a CD40 humano. Los anticuerpos seleccionados pueden estudiarse en un ensayo de exposición en levaduras en el que se presentan variantes de secuencia de CD40hu en la superficie de las células de levadura, o mediante experimentos de intercambio hidrógeno-deuterio, para determinar el epítomo preciso al que se une el anticuerpo.

Pueden producirse determinaciones de epítomos mediante cualquier método conocido de la técnica. En diversas realizaciones, se considera que los anticuerpos anti-CD40hu se unen al mismo epítomo que un mAb anti-CD40hu dado a conocer en la presente memoria si entran en contacto con uno o más de los mismos residuos dentro de por lo menos una región de CD40_{hu}; si hacen contacto con la mayoría de los residuos dentro de por lo menos una región de CD40_{hu}; si hacen contacto con la mayoría de los residuos dentro de cada región de CD40_{hu}; si hacen contacto con la mayoría de contactos a lo largo de toda la longitud de CD40_{hu}; si hacen contacto dentro de todas las mismas regiones distintas del CD40 humano; si hacen contacto con todos los residuos en cualquier región del CD40 humano; o si entran en contacto con todos los mismos residuos en todas las mismas regiones. Las "regiones" del epítomo son grupos de residuos a lo largo de la secuencia primaria.

Entre las técnicas para determinar los anticuerpos que se unen al "mismo epítomo en CD40hu" con los anticuerpos descritos en la presente memoria se incluyen análisis de rayos X de cristales de complejo de antígeno:anticuerpo, que proporcionan una resolución atómica del epítomo. Otros métodos realizan un seguimiento de la unión del anticuerpo a

fragmentos de antígeno o variaciones mutadas del antígeno donde la pérdida de unión debido a una modificación de un residuo aminoácido dentro de la secuencia del antígeno se considera frecuentemente una indicación de un componente epitópico. Los métodos también pueden basarse en la capacidad de un anticuerpo de interés para aislar péptidos cortos específicos (ya sea en forma tridimensional nativa o en forma desnaturalizada) a partir de bibliotecas combinatorias de péptidos de exposición fágica o de un digerido de proteasa de la proteína diana. Los péptidos entonces se consideran candidatos para la definición del epítipo correspondiente al anticuerpo usado para cribar la biblioteca de péptidos. Para el mapeo de epítipos, también se han desarrollado algoritmos computacionales que han mostrado que localizan epítipos discontinuos conformacionales.

El epítipo o región que comprende el epítipo también se puede identificar mediante el cribado para la unión a una serie de péptidos superpuestos que comprenden CD40. Alternativamente, puede utilizarse el método de Jespers et al. (1994) *Biotechnology* 12:899 para guiar la selección de anticuerpos que presenten el mismo epítipo y, por lo tanto, propiedades similares a los anticuerpos anti-CD40 descritos en la presente memoria. Mediante exposición fágica, primero la cadena pesada del anticuerpo anti-CD40 se empareja con un repertorio de cadenas ligeras (preferentemente humanas) para seleccionar un anticuerpo de unión a CD40, y después la nueva cadena ligera se empareja con un repertorio de cadenas pesadas (preferentemente humanas) para seleccionar un anticuerpo (preferentemente humano) de unión a CD40 que presente el mismo epítipo o región epitópica que un anticuerpo anti-CD40hu descrito en la presente memoria. Alternativamente, pueden obtenerse variantes de un anticuerpo descrito en la presente memoria mediante mutagénesis del ADNc codificante de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo.

También puede utilizarse la mutagénesis por barrido de alanina, descrita por Cunningham y Wells (1989) *Science* 244: 1081, o alguna otra forma de mutagénesis puntual de residuos aminoácidos en CD40 (tal como el método de exposición en levaduras proporcionado en el Ejemplo 6) para determinar el epítipo funcional para un anticuerpo anti-CD40.

El epítipo o región del epítipo (una "región del epítipo" es una región que comprende el epítipo o que se superpone con el epítipo) al que se une un anticuerpo específico también puede determinarse mediante la evaluación de la unión del anticuerpo a los péptidos que comprenden fragmentos de CD40. Puede sintetizarse una serie de péptidos superpuestos que comprenden la secuencia de CD40 (p. ej., el CD40 humano) y cribarse para la unión, p. ej., en un ELISA directo, en un ELISA competitivo (en el que el péptido se evalúa por su capacidad para impedir la unión de un anticuerpo a CD40 unido a un pocillo de una placa de microtitulación), o en un chip. Dichos métodos de cribado de péptidos podrían no ser capaces de detectar algunos epítipos funcionales discontinuos, es decir, epítipos funcionales que involucren residuos aminoácidos que no son contiguos a lo largo de la secuencia primaria de la cadena del polipéptido CD40.

También puede identificarse un epítipo mediante la huella proteica basada en EM, tal como la espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX-MS) y la oxidación fotoquímica rápida de proteínas (FPOP, por sus siglas en inglés). La HDX-MS se puede llevar a cabo, p. ej., tal como se describe más detalladamente en Wei et al. (2014) *Drug Discovery Today* 19:95. La FPOP se puede llevar a cabo tal como se describe en, p. ej., Hambley y Gross (2005) *J. American Soc. Mass Spectrometry* 16:2057.

El epítipo que se une a anticuerpos anti-CD40 también puede determinarse mediante métodos estructurales, tales como la determinación de la estructura de cristales de rayos X (p. ej., el documento n.º WO 2005/044853), la modelización molecular y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), incluyendo la determinación de la RMN de los tipos de intercambio H-D de hidrógenos de amida lábiles en CD40 cuando están libres y cuando están unidos en un complejo con el anticuerpo de interés (Zinn-Justin et al. (1992) *Biochemistry* 31:11335; Zinn-Justin et al. (1993) *Biochemistry* 32:6884).

Con respecto a la cristalografía de rayos X, la cristalización puede llevarse a cabo utilizando cualquiera de los métodos conocidos de la técnica (p. ej., Giege et al. (1994) *Acta Crystallogr.* D50:339; McPherson (1990) *Eur. J. Biochem.* 189:1), incluidos los microlitos (p. ej., Chayen (1997) *estructura* 5:1269), la difusión de vapor en gota colgante (p. ej., McPherson (1976) *J. Biol. Chem.* 251:6300), siembra y diálisis. Es deseable usar una preparación de proteínas que presente una concentración de por lo menos aproximadamente 1 mg/ml y preferentemente de entre aproximadamente 10 mg/ml y aproximadamente 20 mg/ml. La cristalización puede conseguirse mejor en una solución precipitante que contenga polietilenglicol 1.000-20.000 (PEG; peso molecular medio comprendido entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 20.000 Da), preferentemente entre 5.000 y aproximadamente 7.000 Da, más preferentemente de aproximadamente 6.000 Da, con concentraciones que están comprendidas entre aproximadamente 10 % y aproximadamente 30 % (p/v). También puede resultar deseable incluir un agente estabilizador de proteínas, p. ej., glicerol en una concentración comprendida entre aproximadamente 0,5 % y aproximadamente 20 %. Una sal adecuada, tal como cloruro sódico, cloruro de litio o citrato sódico, también puede resultar deseable en la solución precipitante, preferentemente en una concentración comprendida entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 1.000 mM. El precipitante se tampona preferentemente a un pH de entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 5,0, preferentemente de aproximadamente 4,0. Los tampones específicos útiles en la solución precipitante pueden variar y son bien conocidos de la técnica (Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, tercera ed., (1994) Springer-Verlag, New York). Entre los ejemplos de tampones útiles se incluyen, aunque sin limitación, HEPES, TRIS,

MES y acetato. Los cristales pueden crecer bajo un amplio intervalo de temperaturas, incluyendo a 2 °C, a 4 °C, a 8 °C y a 26 °C.

Pueden estudiarse los cristales de anticuerpo:antígeno utilizando técnicas bien conocidas de difracción de rayos X y pueden refinarse utilizando software informático, tal como X-PLOR (Yale University, 1992, distribuido por Molecular Simulations, Inc; ver, p. ej., Blundell y Johnson (1985) Meth. Enzymol. 114 y 115, H. W. Wyckoff et al., eds., Academic Press; solicitud publicada de patente US n.º 2004/0014194) y BUSTER (Bricogne (1993) Acta Cryst. D49:37-60; Bricogne (1997) Meth. Enzymol. 276A:361-423, Carter y Sweet, editores.; Roversi et al. (2000) Acta Cryst. D56:1313-1323).

A menos que se indique lo contrario, y con referencia a las reivindicaciones, el epítipo unido a un anticuerpo es el epítipo determinado mediante los métodos HDX-MS.

Anticuerpos anti-CD40 que se unen con alta afinidad

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD40hu de la presente invención se unen a CD40_{hu} con alta afinidad, como los anticuerpos anti-CD40hu dados a conocer en la presente memoria, aumentando su probabilidad de ser agentes terapéuticos eficaces. En diversas realizaciones, los anticuerpos anti-CD40hu de la presente invención se unen a CD40hu con una K_D inferior a 10 nM, 5 nM, 2 nM, 1 nM, 300 pM o 100 pM. En otras realizaciones, los anticuerpos anti-CD40hu de la presente invención se unen a CD40hu con una K_D de entre 2 nM y 100 pM. Entre los ensayos estándares para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos a CD40hu se incluyen los ELISA, RIA, transferencias western, interferometría de biocapa (BLI) y análisis de SPR BIACORE®.

Variantes de secuencia de anticuerpos anti-CD40

Las regiones CDR se delinear utilizando el sistema Kabat (Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación del NIH n.º 91-3242).

Tal como se utiliza en la presente memoria, un anticuerpo murino comprende regiones variables de cadena pesada o ligera que se "derivan de" una secuencia de línea germinal particular si las regiones variables del anticuerpo se obtienen de un sistema que utiliza genes de inmunoglobulina de línea germinal murina, y la secuencia de anticuerpos está suficientemente relacionada con la línea germinal que es más probablemente derivada de la línea germinal dada que de cualquier otra. Tales sistemas incluyen la inmunización de un ratón con el antígeno de interés. La secuencia o secuencias de inmunoglobulinas murinas de línea germinal de la que se "deriva" la secuencia de un anticuerpo puede identificarse mediante la comparación de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo con las secuencias de aminoácidos de las inmunoglobulinas murinas de línea germinal y seleccionando la secuencia de inmunoglobulinas de línea germinal más cercana en secuencia (es decir, mayor % de identidad) a la secuencia del anticuerpo. Un anticuerpo murino que se "deriva de" una secuencia particular de inmunoglobulina de línea germinal puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de línea germinal debido, por ejemplo, a mutaciones somáticas naturales o a la introducción deliberada de mutación dirigida a sitio.

II. Anticuerpos de diseño y modificados

Regiones V_H y V_L

Los anticuerpos de diseño y modificados pueden prepararse utilizando un anticuerpo que presente una o más de las secuencias V_H y/o V_L como material de partida para diseñar un anticuerpo modificado, cuyo anticuerpo modificado puede presentar propiedades alteradas respecto al anticuerpo inicial. Un anticuerpo se puede diseñar mediante modificación de uno o más residuos dentro de una o ambas regiones variables (es decir, V_H y/o V_L), por ejemplo dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones marco. Adicional o alternativamente, un anticuerpo puede diseñarse mediante modificación de residuos dentro de la región o regiones constantes, por ejemplo, para alterar la función o funciones efectoras del anticuerpo.

Un tipo de diseño de la región variable que se puede llevar a cabo es la injertación de CDR. Dicha injertación resulta de uso particular en la humanización de anticuerpos anti-CD40 no humanos que compiten para la unión a los anticuerpos anti-CD40hu dados a conocer en la presente memoria y/o se unen al mismo epítipo que los anticuerpos anti-CD40hu dados a conocer en la presente memoria. Los anticuerpos interactúan con los antígenos diana predominantemente a través de residuos aminoácidos que se encuentran en las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de los CDR son más diversas entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de los CDR. Debido a que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, resulta posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos de referencia específicos mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo de referencia específico injertado en secuencias marco de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (ver, p. ej., Riechmann, L. et al. (1998) Nature 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) Nature 321:522-525; Queen, C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Ver (USA)

86:10029-10033;patente US n.º 5.225.539 de Winter , y patente US n.º 5.530.101, n.º 5.585.089, n.º 5.693.762y n.º 6.180.370 de Queen et al.)

Dichas secuencias de marco pueden obtenerse de bases de datos públicas de ADN o referencias publicadas que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de línea germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de la línea germinal para los genes humanos de la región variable de cadena pesada y ligera se pueden encontrar en la base de datos de secuencias de la línea germinal humana "VBase", así como en Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación del NIH n.º 91-3242; Tomlinson, I. M., et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227:776-798 y Cox, J. P. L. et al. (1994) "A Directory of Human Germ-line VH Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24:827-836.

Se ha encontrado que en determinados casos resulta beneficioso mutar los residuos dentro de las regiones de marco para mantener o mejorar la capacidad de unión a antígeno (ver, p. ej., las patentes US n.º 5.530.101, n.º 5.585.089, n.º 5.693.762y n.º 6.180.370 de Queen et al.)

Se pueden realizar modificaciones en los residuos de marco dentro de V_H y/o V_L , p. ej., para mejorar las propiedades del anticuerpo. Frecuentemente, dichas modificaciones del marco se llevan a cabo para reducir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque es "retromutar" uno o más residuos de marco a la secuencia de línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha sufrido una mutación somática puede contener residuos de marco que difieren de la secuencia de la línea germinal de la que se deriva el anticuerpo. Tales residuos pueden identificarse mediante comparación de las secuencias de marco del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de las que se deriva el anticuerpo. Para devolver las secuencias de la región marco a su configuración de la línea germinal, las mutaciones somáticas pueden ser "retromutadas" a la secuencia de la línea germinal, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis mediada por PCR.

Otro tipo de modificación del marco implica la mutación de uno o más residuos dentro de la región de marco, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar los epítomos de células T y reducir de esta manera la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Este enfoque también se conoce como "desinmunización" y se describe con mayor detalle en la publicación de patente US n.º 20030153043 de Carr et al.

Otro tipo de modificación de la región variable es mutar los residuos aminoácidos dentro de las regiones CDR para mejorar una o más propiedades de unión (p. ej., la afinidad) del anticuerpo de interés. Se puede llevar a cabo mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis mediada por PCR para introducir la mutación o mutaciones y el efecto sobre la unión del anticuerpo, u otra propiedad funcional de interés. Preferentemente se introducen modificaciones conservadoras. Las mutaciones pueden ser adiciones, deleciones o preferentemente sustituciones de aminoácidos. Además, normalmente no se alteran más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos dentro de una región CDR.

Los residuos de metionina en los CDR de anticuerpos pueden oxidarse, lo que resulta en una posible degradación química y la consiguiente reducción de la potencia del anticuerpo. De acuerdo con lo anterior, también se proporcionan anticuerpos anti-CD40 en los que se sustituye uno o más residuos de metionina en los CDR de cadena pesada y/o ligera por residuos aminoácidos que no experimentan degradación oxidativa. De manera similar, pueden eliminarse sitios de desamidación de los anticuerpos anti-CD40, particularmente en los CDR. Los sitios potenciales de glicosilación dentro del dominio de unión a antígeno se eliminan preferentemente para impedir glicosilación que puede interferir con la unión de antígenos. Ver, p. ej., la patente US n.º 5.714.350.

Fc y Fc modificados

Los anticuerpos pueden comprender dominios variables combinados con dominios constantes que comprenden diferentes regiones Fc, seleccionados en función de las actividades biológicas (si las hay) del anticuerpo para el uso previsto. Salfeld (2007) Nat. Biotechnol. 25:1369. Las IgG humanas, por ejemplo, se pueden clasificar en cuatro subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y cada uno de ellos comprende una región Fc que presenta un perfil único para unirse a uno o más de receptores de Fcγ (receptores activadores de FcγRI (CD64), FcγRIIA, FcγRIIC (CD32a,c); FcγRIIA y FcγRIIB (CD16a,b) y receptor inhibitorio FcγRIIB (CD32b), y para el primer componente del complemento (C1q). Las IgG1 e IgG3 humanas se unen a todos los receptores de Fcγ; IgG2 se une a FcγRIIAH131, y con menor afinidad, a FcγRIIAR131 FcγRIIIAV158; IgG4 se une a FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC y FcγRIIIAV158; y el receptor de Fc inhibitorio FcγRIIB presenta una afinidad más baja por IgG1, IgG2 e IgG3 que todos los demás receptores de Fcγ. Bruhns et al. (2009) Blood 113:3716. Los estudios han demostrado que FcγRI no se une a IgG2, y FcγRIIB no se une a IgG2 o IgG4. Id. En general, con respecto a la actividad ADCC, $IgG1 \text{ humana} \geq IgG3 \gg IgG4 \geq IgG2$. En consecuencia, por ejemplo, podría seleccionarse un dominio constante de IgG1, con preferencia a IgG2 o IgG4, para su uso en un medicamento en el que se desea ADCC; podría seleccionarse IgG3 si se activan células NK que expresan FcγRIIA, monocitos de macrófagos; y podría seleccionarse IgG4 si el anticuerpo se va a utilizar para desensibilizar a los pacientes alérgicos. También podría seleccionarse IgG4 si se desea que el anticuerpo carezca de toda función efectora.

Las regiones variables de anti-CD40hu descritas en la presente memoria pueden unirse (p. ej., unirse covalentemente

o fusionarse) a un Fc, p. ej., un Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, que puede ser de cualquier alotipo o isoalotipo, p. ej., para IgG1: G1M, G1m1(a), G1m2(x), G1m3(f), G1m17(z); para IgG2: G2M, G2m23(n); para IgG3: G3M, G3m21(g1), G3m28(g5), G3m11(b0), G3m5(b1), G3m13(b3), G3m14(b4), G3m10(b5), G3m15(s), G3m16(t), G3m6(c3), G3m24(c5), G3m26(u), G3m27(v). Ver, p. ej., Jefferis et al. (2009) mAbs 1:1. La selección del alotipo puede verse influenciada por posibles problemas de inmunogenicidad, p. ej., para minimizar la formación de anticuerpos antifármacos.

Los anticuerpos anti-CD40 de la presente invención presentan una Fc que se une o presenta una unión incrementada a FcγRIIb, lo que puede proporcionar un agonismo mejorado. Ver, p. ej., el documento n.º WO 2012/087928; Li y Ravetch (2011) Science 333:1030; Wilson et al. (2011) Cancer Cell 19:101; White et al. (2011), J. Immunol. 187:1754. Las regiones variables descritas en la presente memoria están unidas a una variante de Fc que mejora la afinidad para el receptor de Fc inhibitorio FcγRIIb, p. ej., para mejorar la actividad inductora o adyuvante de apoptosis. Li y Ravetch (2012) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 109:10966; solicitud publicada de patente de US n.º 2014/0010812. La variante puede proporcionar un anticuerpo con actividades inmunomoduladoras relacionadas con las células FcγRIIb⁺, incluyendo por ejemplo células B y monocitos. La variante de Fc puede proporcionar afinidad selectivamente incrementada a FcγRIIb respecto a uno o más receptores activadores. La variante también puede mostrar un entrecruzamiento mediado por FcR incrementado, lo que resulta en una mayor eficacia terapéutica. Entre las sustituciones para mejorar la afinidad de FcγRIIb se incluyen 237D y 268D. Chu et al. (2008) Mol. Immunol. 45:3926; solicitud publicada de patente US n.º 2006/024298; documento n.º WO 2012/087928. Se puede obtener una mayor especificidad para FcγRIIb (a diferencia de FcγRIIa_{R131}) mediante la adición de la sustitución P238D y otras mutaciones (Mimoto et al. (2013) Protein. Eng. Des. & Selection 26:589; documento n.º WO 2012/1152410). Ver la Tabla 2.

Extensión de semivida

En determinadas realizaciones, el anticuerpo se modifica para incrementar su semivida biológica.

Por ejemplo, la semivida sérica de los anticuerpos de la presente invención puede incrementarse mediante pegilación. Un anticuerpo puede pegilarse para, por ejemplo, aumentar la semivida biológica (p. ej., sérica) del anticuerpo. Para pegar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento del mismo, generalmente se hace reaccionar con un reactivo de polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o derivado aldehído de PEG, bajo condiciones en las que uno o más grupos PEG se unen al anticuerpo o fragmento del anticuerpo. Preferentemente, la pegilación se lleva a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero reactivo soluble en agua análogo). Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "polietilenglicol" pretende comprender cualquiera de las formas de PEG que se han utilizado para derivatizar otras proteínas, tales como mono-alcoxi- o ariloxi (C₁-C₁₀)-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En determinadas realizaciones, el anticuerpo que se va a pegar es un anticuerpo aglicosilado. Los métodos para pegar proteínas son conocidos de la técnica y se pueden aplicar a los anticuerpos descritos en la presente memoria. Ver, por ejemplo, la patente n.º EP 0154316 de Nishimura et al. y la patente n.º EP 0401384 de Ishikawa et al.

Alternativamente, en algunas circunstancias puede resultar deseable disminuir la semivida de un anticuerpo de la presente invención, en lugar de aumentarla. Los fragmentos de anticuerpos pueden fusionarse con la albúmina sérica humana, p. ej., en un constructo de proteína de fusión, para aumentar la semivida. Yeh et al. (1992) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 89:1904-38). Alternativamente, se puede construir un anticuerpo biespecífico con un primer dominio de unión a antígeno de la presente invención y un segundo dominio de unión a antígeno que se une a la albúmina sérica humana (HSA, por sus siglas en inglés). Ver la solicitud publicada de patente n.º WO 2009/127691 y referencias de patentes citadas en el mismo. Alternativamente, se pueden añadir secuencias especializadas de polipéptidos a fragmentos de anticuerpos para aumentar la semivida, p. ej., secuencias de polipéptido "XTEN". Schellenberger et al. (2009) Nat. Biotechnol. 27:1186; Int'l Pat. Appl. Pub. Documento n.º WO 2010/091122.

Fc variantes adicionales

Las afinidades y propiedades de unión de una variante de Fc para sus ligandos (receptores de Fc) pueden determinarse mediante una variedad de métodos de ensayo *in vitro* (ensayos bioquímicos o inmunológicos) conocidos de la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, métodos de equilibrio (p. ej., ensayo de inmunosorción ligada a enzimas (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA)), o cinética (p. ej., análisis de SPR BIACORE®), y otros métodos, tales como ensayos de unión indirecta, ensayos de inhibición competitiva, transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET, por sus siglas en inglés), electroforesis en gel y cromatografía (p. ej., filtración en gel). Dichos métodos y otros pueden utilizar un marcaje en uno o más de los componentes a examen y/o utilizar una variedad de métodos de detección, incluyendo, aunque sin limitación, marcajes cromogénicos, fluorescentes, luminiscentes o isotópicos. Una descripción detallada de las afinidades y cinética de unión se puede encontrar en Paul, W. E., ed., Fundamental Immunology, 4a ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), que se centra en las interacciones anticuerpo-inmúnógeno.

La "glicoingeniería" también se puede utilizar para modificar las propiedades antiinflamatorias de un constructo de IgG mediante modificación del contenido de α2,6-sialilo de las cadenas carbohidrato unidas en Asn297 de las regiones Fc,

en donde una mayor proporción de formas $\alpha 2,6$ -sialadas da lugar a efectos antiinflamatorios mejorados. Ver Nimmerjahn et al. (2008) Ann. Rev. Immunol. 26:513. A la inversa, la reducción de la proporción de anticuerpos con carbohidratos $\alpha 2,6$ -sialilados puede resultar útil en casos en los que no se deseen propiedades antiinflamatorias. Los métodos para modificar el contenido de $\alpha 2,6$ -sialilación de anticuerpos, por ejemplo, mediante la purificación selectiva de formas $\alpha 2,6$ -sialiladas o mediante modificación enzimática, se proporcionan en la solicitud publicada de patente US n.º 2008/0206246.

III. Propiedades físicas de anticuerpos

Cada anticuerpo presentará un punto isoelectrónico (pI) único, que generalmente se encuentra comprendido en el intervalo de pH de entre 6 y 9,5. El pI para un anticuerpo IgG1 normalmente está comprendido en el intervalo de pH de entre 7 y 9,5 y el pI para un anticuerpo IgG4 normalmente está comprendido en el intervalo de pH de entre 6 y 8. Se conjetura que los anticuerpos con un pI fuera del intervalo normal podrían presentar cierto despliegue e inestabilidad bajo las condiciones *in vivo*. Por lo tanto, resulta preferente disponer de un anticuerpo anti-CD40 que presente un valor de pI comprendido en el intervalo normal.

Cada anticuerpo presentará una temperatura de fusión característica, en donde una temperatura de fusión más alta indica una mayor estabilidad general *in vivo* (Krishnamurthy R y Manning M C (2002) Curr. Pharm. Biotechnol. 3:361-71). Generalmente, resulta preferente que la TM1 (la temperatura de despliegue inicial) sea mayor que 60 °C, preferentemente mayor que 65 °C, todavía más preferentemente mayor que 70 °C. El punto de fusión de un anticuerpo se puede medir utilizando calorimetría de barrido diferencial (Chen et al (2003) Pharm. Res. 20:1952-60; Ghirlando et al (1999) Immunol. Lett. 68:47-52) o dicroísmo circular (Murray et al. (2002) J. Chromatogr. Sci. 40:343-9).

En una realización preferente, se seleccionan anticuerpos que no se degradan rápidamente. La degradación de un anticuerpo puede medirse mediante electroforesis capilar (CE, por sus siglas en inglés) y MALDI-MS (Alexander A J y Hughes D E (1995) Anal. Chem. 67:3626-32).

En otra realización preferente, se seleccionan anticuerpos que presentan efectos mínimos de agregación, lo que puede llevar a la inducción de una respuesta inmunitaria no deseada y/o propiedades farmacocinéticas alteradas o desfavorables. Generalmente, los anticuerpos resultan aceptables con una agregación de 25 % o inferior, preferentemente de 20 % o inferior, todavía más preferentemente de 15 % o inferior, todavía más preferentemente de 10 % o inferior y todavía más preferentemente de 5 % o inferior. La agregación se puede medir mediante varias técnicas, incluyendo la columna de exclusión por tamaño (SEC), la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y la dispersión lumínica.

IV. Moléculas de ácidos nucleicos

Otro aspecto descrito en la presente memoria se refiere a las moléculas de ácido nucleico codificantes de los anticuerpos descritos en la presente memoria. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular, o en una forma parcial o sustancialmente purificada. Un ácido nucleico está "aislado" o "se vuelve sustancialmente puro" cuando se purifica respecto a otros componentes celulares u otros contaminantes, p. ej., otros ácidos nucleicos celulares (p. ej., otro ADN cromosómico, p. ej., ADN cromosómico que unido al ADN aislado en estado natural) o proteínas, mediante técnicas estándares, incluyendo el tratamiento alcalino/con SDS, la formación de bandas en CsCl, la cromatografía de columna, enzimas de restricción, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas de la técnica. Ver F. Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Un ácido nucleico descrito en la presente memoria puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede o no contener secuencias intrónicas. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria pueden obtenerse utilizando técnicas estándares de biología molecular. Para los anticuerpos expresados por hibridomas (p. ej., hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos portadores de genes de inmunoglobulina humana tal como se describe en mayor detalle posteriormente), los ADNc codificantes de cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo producido por el hibridoma pueden obtenerse mediante la amplificación por PCR estándar o mediante técnicas de clonación de ADNc. Para los anticuerpos obtenidos de una biblioteca génica de inmunoglobulinas (p. ej., utilizando técnicas de exposición fágica), el ácido nucleico codificante del anticuerpo puede recuperarse de la biblioteca.

Una vez se han obtenido fragmentos de ADN codificantes de los segmentos V_H y V_L , estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente mediante técnicas de ADN recombinante estándares, por ejemplo, para convertir los genes de región variable a genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, a genes de fragmentos Fab o a un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN codificante de V_L o V_H está ligado operablemente a otro fragmento de ADN codificante de otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un conector flexible. La expresión "ligado operablemente", tal como se utiliza en el presente contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN se unen de tal manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN se mantienen en el mismo marco.

El ADN aislado que codifica la región V_H se puede convertir en un gen de cadena pesada de longitud completa uniendo operablemente el ADN codificante de V_H a otra molécula de ADN codificante de regiones constantes de cadena pesada (bisagra, CH1, CH2 y/o CH3). Las secuencias de genes humanos de la región constante de cadena pesada son conocidas de la técnica (ver, p. ej., Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH publicación n.º 91-3242) y fragmentos de ADN que comprenden dichas regiones pueden obtenerse mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena pesada es una región de IgG1. Para un gen de cadena pesada del fragmento Fab, el ADN codificante de V_H puede ligarse operablemente a otra molécula de ADN codificante de solamente la región constante de cadena pesada, CH1.

El ADN aislado codificante de la región V_L se puede convertir en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como un gen de Fab de cadena ligera) mediante el ligamiento operable del ADN codificante de V_L a otra molécula de ADN codificante de la región constante de cadena ligera, C_L . Las secuencias de genes humanos de región constante de cadena pesada son conocidas de la técnica (ver, p. ej., Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH publicación n.º 91-3242) y fragmentos de ADN que comprenden dichas regiones pueden obtenerse mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN codificantes de V_H y V_L se ligan operablemente a otro fragmento codificante de un conector flexible, p. ej., codificante de la secuencia de aminoácidos (Gly4-Ser)3, de manera que las secuencias de V_H y V_L puedan expresarse en forma de una proteína contigua de una sola cadena, con las regiones V_L y V_H unidas mediante el conector flexible (ver, p. ej., Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) *Nature* 348:552-554).

V. Generación de anticuerpos

Pueden producirse diversos anticuerpos de la presente invención, utilizando una variedad de técnicas conocidas, tales como la técnica estándar de hibridación de células somáticas descrita por Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Aunque resultan preferentes los procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio también se pueden utilizar otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, p. ej., la transformación vírica u oncogénica de linfocitos B, la técnica de exposición fágica utilizando bibliotecas de genes de anticuerpos humanos.

El sistema animal preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridoma en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Los protocolos de inmunización y las técnicas para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión son conocidos de la técnica. Las parejas de fusión (p. ej., células de mieloma murino) y los procedimientos de fusión también son conocidos.

Los anticuerpos quiméricos o humanizados descritos en la presente memoria pueden prepararse basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado tal como se ha descrito anteriormente. Las inmunoglobulinas de cadena pesada y de cadena ligera pueden obtenerse a partir del hibridoma murino de interés y diseñarse para que contengan secuencias de inmunoglobulinas no murinas (p. ej., humanas) utilizando técnicas estándares de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas se pueden unir a regiones constantes humanas utilizando métodos conocidos de la técnica (ver, p. ej., la patente US n.º 4.816.567 de Cabilly et al.). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones de CDR murinas pueden insertarse en un marco humano utilizando métodos conocidos de la técnica (ver, p. ej., la patente US n.º 5.225.539 de Winter y las patentes US n.º 5.530.101; n.º 5.585.089, n.º 5.693.762 y n.º 6.180.370 de Queen et al.).

En una realización, los anticuerpos descritos en la presente memoria son anticuerpos monoclonales humanos. Tales anticuerpos monoclonales humanos con diana en CD40 humano pueden generarse utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que transportan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema del ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones denominados en la presente memoria ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en la presente memoria "ratones de Ig humana".

El ratón HuMAb® (Medarex, Inc.) contiene miniloci del gen de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulinas humanas de cadena pesada (μ y γ) y de cadena ligera κ no reorganizadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos de las cadenas μ y κ (ver, p. ej., Lonberg, et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859). De acuerdo con lo anterior, los ratones muestran una expresión reducida de IgM o κ de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes humanos de cadena pesada y ligera introducidos experimentan mutación por cambio de clase y mutación somática, generando IgG κ monoclonales humanos de alta afinidad (Lonberg, N. et al. (1994), *supra*; revisado en Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764:536-546). La preparación y el uso de ratones HuMAb, y las modificaciones genómicas que portan dichos ratones, se describen con más detalle en Taylor, L. et al. (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaillon et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 90:3720-3724; Choi et al. (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaillon et al. (1994), *J. Immunol.* 152:2912-

2920; Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6: 579-591 y Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851. Ver, además, las patentes US n.º 5.633.425, n.º 5.789.650, n.º 5.877.397, n.º 5.545.806, n.º 5.569.825, n.º 5.625.126, n.º 5.661.016, n.º 5.814.318, n.º 5.874.299 y n.º 5.770.429; todas de Lonberg y Kay; la patente US n.º 5.545.807 de Surani et al., las publicaciones de patente PCT n.º WO 92/03918, n.º WO 93/12227, n.º WO 94/25585, n.º WO 97/13852, n.º WO 98/24884 y n.º WO 99/45962, todas de Lonberg y Kay, y la publicación de patente PCT n.º WO 01/14424 de Korman et al.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en la presente memoria se producen utilizando un ratón que porta secuencias de inmunoglobulinas humanas en transgenes y transcromosomas, tal como un ratón que porta un transgén de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana. Estos ratones, a los que se hace referencia en la presente memoria como "ratones KM", se describen en detalle en la publicación de patente PCT n.º WO 02/43478 de Ishida et al.

Además, los sistemas animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y pueden usarse para producir los anticuerpos anti-CD40hu descritos en la presente memoria. Por ejemplo, se puede utilizar un sistema transgénico alternativo denominado Xenomouse (Abgenix, Inc.); estos ratones se describen, por ejemplo, en las patentes US n.º 5.939.598, n.º 6.075.181, n.º 6.114.598 ; n.º 6.150.584 y n.º 6.162.963 de Kucherlapati et al.

Además, los sistemas animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y pueden usarse para producir anticuerpos anti-CD40 descritos en la presente memoria. Por ejemplo, se pueden utilizar ratones que portan tanto un transcromosoma humano de cadena pesada como un transcromosoma humano de cadena ligera, conocidos como "ratones TC"; tales ratones se describen en Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:722-727). Además, se han descrito en la técnica vacas portadoras de transcromosomas humanos de cadena pesada y ligera (Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894) y puede utilizarse para producir los anticuerpos anti-CD40hu descritos en la presente memoria.

Entre los sistemas de ratón adicionales descritos en la técnica para producir anticuerpos humanos, p. ej., anticuerpos anti-CD40hu humanos, se incluyen (i) el ratón VELOCIMMUNE® (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.), en el que las regiones variables pesadas y ligeras endógenas del ratón han sido sustituidas, mediante recombinación homóloga, por regiones variables de cadenas pesada y ligera humanas, operablemente ligadas a regiones constantes endógenas del ratón, de manera que se producen anticuerpos quiméricos (V humano/C de ratón) en el ratón, y después se convierten seguidamente en anticuerpos completamente humanos utilizando técnicas estándares de ADN recombinante, y (ii) el ratón MeMo® (Merus Biopharmaceuticals, Inc.), en el que el ratón contiene regiones variables de cadena pesada humana no reorganizadas, aunque una sola región variable de cadena ligera común humana reorganizada. Tales ratones, y el uso de los mismos para producir anticuerpos, se describen en, por ejemplo, los documentos n.º WO 2009/15777, n.º US 2010/0069614, n.º WO 2011/072204, n.º WO 2011/097603, n.º WO2011/163311, n.º WO 2011/163314, n.º WO 2012/148873, n.º US 2012/0070861 y n.º US 2012/0073004.

Los anticuerpos monoclonales humanos descritos en la presente memoria también pueden prepararse utilizando métodos de exposición fágica para el cribado de bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana. Tales métodos de exposición fágica para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica. Ver, por ejemplo: las patentes US n.º 5.223.409, n.º 5.403.484 y n.º 5.571.698 de Ladner et al.; patentes US n.º 5.427.908 y n.º 5.580.717 de Dower et al.; patentes US n.º 5.969.108 y n.º 6.172.197 de McCafferty et al., y patentes US n.º 5.885.793, n.º 6.521.404, n.º 6.544.731, n.º 6.555.313, n.º 6.582.915 y n.º 6.593.081 de Griffiths et al.

Los anticuerpos monoclonales humanos descritos en la presente memoria también pueden prepararse utilizando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunitarias humanas de tal manera que se pueda generar una respuesta de anticuerpos humanos después de la inmunización. Tales ratones se describen en, por ejemplo, las patentes US n.º 5.476.996 y n.º 5.698.767 de Wilson et al.

Inmunizaciones

Para generar anticuerpos completamente humanos contra CD40 humano, los ratones o ratones transgénicos o transcromosómicos que contengan genes de inmunoglobulina humana (p. ej., HCo12, HCo7 o ratones KM) pueden inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida del antígeno CD40 y/o células que expresan CD40, tal como se describe para otros antígenos, por ejemplo, por Lonberg et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 y documento n.º WO 98/24884. Alternativamente, los ratones pueden inmunizarse con ADN codificante de CD40 humano. Preferentemente, los ratones tendrán 6 a 16 semanas de edad en la primera infusión. Por ejemplo, puede utilizarse una preparación purificada o enriquecida (5 a 50 µg) de antígeno CD40 humano recombinante para inmunizar los ratones por vía intraperitoneal. En el caso de que las inmunizaciones con una preparación purificada o enriquecida de antígeno CD40 no produzcan anticuerpos, los ratones también pueden ser inmunizados con células que expresen CD40, p. ej., una línea celular, para promover respuestas inmunes.

La experiencia acumulada con diversos antígenos ha demostrado que los ratones transgénicos HuMAb responden mejor cuando se inmunizan inicialmente por vía intraperitoneal (IP) o subcutánea (SC) con antígeno en el adyuvante

de Ribí, seguido de inmunizaciones IP/SC cada dos semanas (hasta un total de 10) con antígeno en el adyuvante de Ribí. Puede realizarse un seguimiento de la respuesta inmunitaria a lo largo del protocolo de inmunización con muestras de plasma obtenidas mediante sangrados retroorbitales. El plasma puede analizarse mediante ELISA y FACS (tal como se describe posteriormente), y los ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-CD40 pueden utilizarse para fusiones. Los ratones pueden recibir un refuerzo intravenoso de antígeno 3 días antes del sacrificio y la extirpación del bazo y los ganglios linfáticos. Se espera que sea necesario realizar 2-3 fusiones para cada inmunización. Normalmente se inmunizaron entre 6 y 24 ratones por cada antígeno. Por lo general, se utilizaron las cepas HCo7, HCo12 y KM. Además, tanto el transgén HCo7 como el HCo12 pueden producirse juntos en un solo ratón que presente dos transgenes de cadena pesada humana diferentes (HCo7/HCo12).

Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra CD40

Para generar hibridomas que produzcan los anticuerpos monoclonales descritos en la presente memoria, los esplenocitos y/o células de ganglios linfáticos de ratones inmunizados pueden aislarse y fusionarse con una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes se pueden cribar para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, pueden fusionarse suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados, con células de mieloma de ratón no secretoras Sp2/0 (ATCC n.º CRL 1581) con PEG al 50 %. Las células se siembran a razón de aproximadamente 2×10^5 en placa de microtitulación de fondo plano, seguido de la incubación durante dos semanas en medio selectivo que contiene suero fetal Clone al 10 %, medio acondicionado "653" al 18 %, origen al 5 % (IGEN), L-glutamina 4 mM, piruvato sódico 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina, 50 mg/ml de gentamicina y 1X HAT (Sigma). Después de aproximadamente dos semanas, las células se pueden cultivar en medio en el que se sustituye HAT por HT. A continuación, se pueden cribar pocillos individuales mediante ELISA para detectar anticuerpos monoclonales IgM e IgG humanos. Una vez se produce el crecimiento extenso del hibridoma, el medio puede observarse generalmente después de 10 a 14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpos pueden sembrarse nuevamente en placas, cribarse de nuevo, y si todavía son positivos para IgG humana, los anticuerpos monoclonales pueden subclonarse por lo menos dos veces mediante dilución limitante. Los subclones estables seguidamente pueden cultivarse *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpos en medio de cultivo de tejidos para su caracterización.

Para purificar los anticuerpos monoclonales, se pueden cultivar hibridomas seleccionados en matraces de dos litros para la purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes se pueden filtrar y concentrar antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sefrosa (Pharmacia, Piscataway, N.J.). La IgG eluida se puede comprobar mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para garantizar la pureza. La solución tampón se puede intercambiar en PBS, y la concentración se puede determinar mediante DO280 utilizando el coeficiente de extinción 1,43. Los anticuerpos monoclonales se pueden dividir en alícuotas y almacenarlas a -80°C .

VI. Preparación de anticuerpos

Generación de transfectomas productores de anticuerpos monoclonales contra CD40

Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse en un transfectoma de células huésped utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección génica como es bien conocido de la técnica (Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).

Por ejemplo, para expresar anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de los mismos, los ADN que codifican cadenas ligeras o pesadas parciales o completas, pueden obtenerse mediante técnicas de biología molecular estándares (p. ej., mediante amplificación por PCR o clonación de ADNc utilizando un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés) y los ADN se pueden insertar en vectores de expresión de tal manera que los genes estén operablemente ligados a secuencias de control transcripcional y traduccional. En este contexto, la expresión "ligado operablemente" pretende referirse a un gen de anticuerpo que está ligado en un vector de tal manera que las secuencias de control transcripcional y traduccional dentro del vector presentan su función prevista de regulación de la transcripción y la traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se seleccionan de manera que sean compatibles con la célula huésped de expresión utilizada. El gen de la cadena ligera de anticuerpo y el gen de cadena pesada de anticuerpo se pueden insertar en el vector separado o insertarse ambos genes en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpos se insertan en el vector o vectores de expresión mediante métodos estándares (p. ej., mediante ligamiento de sitios de restricción complementarios en el fragmento de gen de anticuerpo y vector, o mediante ligamiento de extremos romos si no hay sitios de restricción). Las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para crear genes de anticuerpos de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo mediante la inserción de los mismos en vectores de expresión que ya codifican las regiones constantes de cadena pesada y cadena ligera del isotipo deseado, de manera que el segmento V_H esté ligado operablemente al segmento C_H dentro del vector y el segmento V_L esté ligado operablemente al segmento C_L dentro del vector. Adicional o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede ser codificante de un péptido de señal que facilite la secreción de la cadena de anticuerpo a partir de la célula huésped. El gen de la cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de tal manera que el péptido de señal esté ligado en el mismo marco que el extremo aminoterminal del gen de la cadena de anticuerpo. El péptido de señal puede

ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido de señal heterólogo (es decir, un péptido de señal de una proteína no inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinante pueden portar secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena de anticuerpo en la célula huésped. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, intensificadores y otros elementos de control de la expresión (p. ej., señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de la cadena de anticuerpo. Se describen ejemplos de tales secuencias reguladoras en, por ejemplo, Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). El experto en la materia apreciará que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que va a transformarse, el nivel de expresión de proteína deseado, *etc.* Entre las secuencias reguladoras preferentes para la expresión de las células huésped de mamífero se incluyen elementos víricos que inducen niveles elevados de expresión de proteínas en las células de mamífero, tales como promotores y/o intensificadores derivados del citomegalovirus (CMV), del virus 40 del simio (SV40, por sus siglas en inglés), de adenovirus (p. ej., el promotor mayor tardío de adenovirus (AdMLP, por sus siglas en inglés) y el polio. Alternativamente, se pueden utilizar secuencias reguladoras no víricas, tales como el promotor de ubiquitina o el promotor de β -globina. Todavía adicionalmente, elementos reguladores compuestos por secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor SR α , que contiene secuencias del promotor temprano del SV40 y la repetición terminal larga del virus de la leucemia de células T humanas tipo 1 (Takebe, Y. et al. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

Además de los genes de la cadena de anticuerpo y secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en las células huésped (p. ej., orígenes de la replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector (ver, p. ej., las patentes US n.º 4.399.216, n.º 4.634.665 y n.º 5.179.017, todas ellas de Axel *et al.*). Por ejemplo, normalmente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Entre los genes marcadores seleccionables preferidos se incluyen el gen dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células huésped dhfr⁻ con selección/amplificación con metotrexato) y el gen *neo* (para la selección con G418).

Para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas, el vector o vectores de expresión codificantes de las cadenas pesadas y ligeras se transfectan en una célula huésped mediante técnicas estándares. Las diversas formas del término "transfección" están destinadas a comprender una amplia variedad de técnicas comúnmente utilizadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, p. ej., electroporación, precipitación con fosfato cálcico, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos descritos en la presente memoria en células huésped procariotas o eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y preferentemente células huésped de mamífero, es la más preferente porque tales células eucariotas, y, en particular, las células de mamífero, es más probable que las células procariotas que ensamblen y segreguen un anticuerpo adecuadamente plegado e inmunitariamente activo. Se ha informado que la expresión procariótica de genes de anticuerpos es ineficaz para la producción de altos rendimientos de anticuerpos activos (Boss, M. A. y Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13). Los anticuerpos de la presente invención también pueden producirse en cepas glicomanipuladas de la levadura *Pichia pastoris*. Li et al. (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:210.

Entre las células huésped de mamífero preferentes para expresar los anticuerpos recombinantes descritos en la presente memoria se incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo las células CHO dhfr⁻ descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.)* 77:4216-4220, utilizado con un marcador seleccionable DHFR, p. ej., tal como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En particular, para el uso con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión del gen GS, dado a conocer en los documentos n.º WO 87/04462, n.º WO 89/01036 y n.º EP 338.841. Cuando los vectores de expresión recombinante codificantes de genes de anticuerpos se introducen en las células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen mediante el cultivo de las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo al medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo utilizando métodos estándares de purificación de proteínas.

Los extremos N- y C-terminales de las cadenas polipeptídicas de los anticuerpos de la presente invención pueden diferir de la secuencia esperada debido a modificaciones post-traduccionales comúnmente observadas. Por ejemplo, los residuos de lisina C-terminal con frecuencia faltan en las cadenas pesadas de los anticuerpos. Dick et al. (2008) *Biotechnol. Bioeng.* 100:1132. Los residuos N-terminales de glutamina, y en menor medida los residuos de glutamato, se convierten con frecuencia en residuos de piroglutamato tanto en las cadenas ligeras como pesadas de los anticuerpos terapéuticos. Dick et al. (2007) *Biotechnol. Bioeng.* 97:544; Liu et al. (2011) *J. Biol. Chem.* 286:11211.

VII. Ensayos

Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden ser sometidos a ensayo para la unión a CD40, por ejemplo, mediante ELISA estándar. En resumen, las placas de microtitulación se recubren con CD40 purificado a 1-2 µg/ml en PBS, y después se bloquean con albúmina sérica bovina al 5 % en PBS. Se añaden diluciones de anticuerpos (p. ej., diluciones de plasma de ratones inmunizados con CD40) se añaden a cada pocillo y se incuban durante 1 a 2 horas a 37 °C. Las placas se lavan con PBS/Tween y después se incuban con reactivo secundario (p. ej., para anticuerpos humanos, o anticuerpos que de otra manera presentan una región constante de cadena pesada humana, un reactivo policlonal de cabra específicamente anti-Fc de IgG humana) conjugado con peroxidasa del rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés) durante 1 hora a 37 °C. Después del lavado, las placas se revelan con sustrato de ABTS (Moss Inc, producto: ABTS-1000) y se analizan con un espectrofotómetro a DO 415-495. Los sueros de ratones inmunizados se criban posteriormente mediante citometría de flujo para unirse a una línea celular que expresa CD40 humano, pero no a una línea celular de control que no expresa CD40. En resumen, la unión de anticuerpos anti-CD40 se evalúa mediante incubación de células CHO expresantes de CD40 con el anticuerpo anti-CD40 a una dilución 1:20. Las células se lavan y se detecta la unión con un anticuerpo anti-IgG humana marcado con PE. Los análisis citométricos de flujo se llevan a cabo utilizando una citometría de flujo FACScan (Becton Dickinson, San José, CA). Preferentemente, para las fusiones se utilizan los ratones que desarrollan los títulos más altos. Se pueden llevar a cabo experimentos análogos utilizando anticuerpos de detección de antirratón si se van a detectar anticuerpos anti-CD40hu de ratón.

Un ELISA descrito anteriormente puede usarse para cribar para anticuerpos y, de esta manera, hibridomas que producen anticuerpos que muestran reactividad positiva con el inmunógeno CD40. Los hibridomas que producen anticuerpos que se unen, preferentemente con alta afinidad, a CD40 a continuación pueden subclonarse y caracterizarse. A continuación, puede seleccionarse un clon de cada hibridoma, que retenga la reactividad de las células parentales (mediante ELISA), para preparar un banco de células y para la purificación de anticuerpos.

Para purificar los anticuerpos anti-CD40, se pueden cultivar hibridomas seleccionados en matraces de agitación de dos litros para la purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes se pueden filtrar y concentrar antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sefara (Pharmacia, Piscataway, N.J.). La IgG eluida se puede comprobar mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para garantizar la pureza. La solución tampón se puede intercambiar en PBS, y la concentración se puede determinar mediante DO280 utilizando el coeficiente de extinción 1,43. Los anticuerpos monoclonales se pueden dividir en alícuotas y almacenarlas a -80 °C.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-CD40 seleccionados se unen a epítopos únicos, cada anticuerpo puede biotinilarse utilizando reactivos disponibles comercialmente (Pierce, Rockford, IL). La unión de mAb biotinilado se puede detectar con una sonda marcada con estreptavidina. Se pueden llevar a cabo estudios de competición con anticuerpos monoclonales no marcados y anticuerpos monoclonales biotinilados utilizando placas de ELISA recubiertas con CD40 tal como se ha descrito anteriormente.

Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, pueden llevarse a cabo ensayos ELISA de isotipo utilizando reactivos específicos para anticuerpos de un isotipo particular. Por ejemplo, para determinar el isotipo de un anticuerpo monoclonal humano, los pocillos de placas de microtitulación pueden recubrirse con 1 µg/ml de inmunoglobulina antihumana durante la noche a 4 °C. Después de bloquear con BSA al 1 %, se hacen reaccionar las placas con 1 µg/ml o menos de anticuerpos monoclonales de ensayo o controles de isotipo purificados, a temperatura ambiente durante una a dos horas. A continuación, los pocillos pueden hacerse reaccionar con las sondas específicas de IgG1 humana o específicas de IgM humana, conjugadas con fosfatasa alcalina. Las placas se revelan y se analizan tal como se ha descrito anteriormente.

Para someter a ensayo la unión de los anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan CD40, se puede utilizar la citometría de flujo. En resumen, se mezclan líneas celulares que expresan CD40 unido a membrana (cultivadas bajo condiciones de crecimiento estándares) con diversas concentraciones de anticuerpos monoclonales en PBS que contienen BSA al 0,1 %, a 4 °C durante 1 hora. Después del lavado, las células se hacen reaccionar con anticuerpos anti-IgG marcados con ficoeritrina (PE) bajo las mismas condiciones que la tinción de anticuerpos primarios. Las muestras pueden analizarse mediante el instrumento FACScan utilizando las propiedades lumínicas y de dispersión lateral para clasificar células individuales y se determina la unión de los anticuerpos marcados. Se puede utilizar un ensayo alternativo con microscopía de fluorescencia (adicionalmente o en sustitución de) el ensayo de citometría de flujo. Las células se pueden teñir exactamente tal como se ha indicado anteriormente y examinarlas mediante microscopía de fluorescencia. Este método permite la visualización de células individuales, pero puede presentar una menor sensibilidad, según la densidad del antígeno.

Los anticuerpos anti-CD40hu pueden analizarse adicionalmente para la reactividad con el antígeno CD40 mediante transferencia western. En resumen, los extractos celulares de células que expresan CD40 pueden prepararse y someterse a electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato sódico. Después de la electroforesis, los antígenos separados se transfieren a membranas de nitrocelulosa, se bloquean con suero de ratón al 20 % y se sondan con los anticuerpos monoclonales a someter a ensayo. La unión de IgG se puede detectarse utilizando fosfatasa alcalina anti-IgG y revelarse con tabletas de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

Entre los métodos para analizar la afinidad de unión, la reactividad cruzada y la cinética de unión de diversos

anticuerpos anti-CD40 se incluyen ensayos estándar conocidos de la técnica, por ejemplo, análisis por interferometría de capas biológicas (BLI, por sus siglas en inglés) y análisis de resonancia del plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés) BIACORE® utilizando un instrumento de SPR BIACORE®2000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia).

El anticuerpo de la invención se une específicamente a la región extracelular de CD40 humano. El anticuerpo puede unirse específicamente a un dominio particular (p. ej., un dominio funcional) dentro del dominio extracelular de CD40. El anticuerpo puede unirse específicamente a la región extracelular de CD40 humano y a la región extracelular de CD40 de *Cynomolgus*.

VIII. Moléculas biespecíficas

Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden utilizarse para formar moléculas biespecíficas. Un anticuerpo anti-CD40, o fragmentos de unión a antígeno del mismo que se unen al antígeno, puede derivatizarse o unirse a otra molécula funcional, p. ej., otro péptido o proteína (p. ej., otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se une a por lo menos dos sitios de unión o moléculas objetivo diferentes. De hecho, el anticuerpo descrito en la presente memoria puede derivatizarse o unirse a más de una molécula funcional para generar moléculas multiespecíficas que se unen a más de dos sitios de unión y/o moléculas diana diferentes; estas moléculas multiespecíficas también están destinadas a estar comprendidas en la expresión "molécula biespecífica" tal como se utiliza en la presente memoria. Para crear una molécula biespecífica descrita en la presente memoria, un anticuerpo descrito en la presente memoria puede unirse funcionalmente (p. ej., mediante acoplamiento químico, fusión génica, asociación no covalente o de otro modo) a una o más moléculas de unión, tal como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de unión, de tal manera que resulta una molécula biespecífica.

De acuerdo con lo anterior, en la presente memoria se proporcionan moléculas biespecíficas que comprenden por lo menos una primera especificidad de unión para CD40 y una segunda especificidad de unión para un segundo epítipo diana. En una realización descrita en la presente memoria en la que la molécula biespecífica es multiespecífica, la molécula puede incluir, además, una tercera especificidad de unión.

En una realización, las moléculas biespecíficas descritas en la presente memoria comprenden como especificidad de unión por lo menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, incluyendo, p. ej., un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, o un Fv de cadena sencilla. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadenas ligeras o pesadas, o cualquier fragmento mínimo del mismo, tal como un Fv o una estructura de cadena sencilla, tal como se describe en Ladner et al. patente US n.º 4.946.778.

Aunque los anticuerpos monoclonales humanos resultan preferentes, otros anticuerpos que se pueden utilizar en las moléculas biespecíficas descritas en la presente memoria son anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos y humanizados.

Las moléculas biespecíficas descritas en la presente memoria pueden prepararse mediante conjugación de las especificidades de unión constituyentes utilizando métodos conocidos de la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica puede generarse por separado y después conjugarse entre sí. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, se puede utilizar una variedad de agentes de acoplamiento o entrecruzamiento para la conjugación covalente. Entre los ejemplos de agentes de entrecruzamiento se incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA, por sus siglas en inglés), 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzoico) (DTNB, por sus siglas en inglés), o-fenilenedimaleimida (oPDM, por sus siglas en inglés), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP, por sus siglas en inglés) y 4-(N-maleimidometil)ciclohexán-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC, por sus siglas en inglés) (ver, p. ej., Karpovsky et al. (1984) J Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:8648). Entre otros métodos se incluyen los descritos en Paulus (1985) Behring Ins Mitt. n.º. 78, 118-132; Brennan et al. (1985) Science 229:81-83 y Glennie et al. (1987), J. Immunol. 139: 2367-2375). Los agentes de conjugación preferentes son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, pueden conjugarse a través de la unión sulfhidrilo de las regiones de bisagra C-terminales de las dos cadenas pesadas. En una realización particularmente preferente, la región de la bisagra se modifica para que contenga un número impar de residuos sulfhidrilo, preferentemente uno, antes de la conjugación.

Alternativamente, ambas especificidades de unión pueden estar codificadas en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula huésped. Este método resulta particularmente útil cuando la molécula biespecífica es una proteína de fusión mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ o proteína de fusión de ligando x Fab. Una molécula biespecífica descrita en la presente memoria puede ser una molécula de cadena sencilla que comprende un anticuerpo de cadena sencilla y un determinante de unión, o una molécula biespecífica de cadena sencilla que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender por lo menos dos moléculas de cadena sencilla. Los métodos para preparar moléculas biespecíficas se describen en, por ejemplo, la patente US n.º 5.260.203,

la patente US n.º 4.881.175; patente US n.º 5.132.405, la patente US n.º 5.091.513, la patente US n.º 5.476.786, la patente US n.º 5.013.653, la patente US n.º 5.455.030, la patente US n.º 5.258.498 y la patente US n.º 5.482.858.

La unión de las moléculas biespecíficas a sus dianas específicas puede confirmarse utilizando métodos reconocidos de la técnica, tales como el ensayo de inmunosorción ligada a enzimas (ELISA), el radioinmunoensayo (RIA), el análisis de FACS, el bioensayo (p. ej., la inhibición del crecimiento), y el análisis de moléculas biespecíficas o el ensayo de transferencia western. Cada uno de dichos ensayos generalmente detecta la presencia de complejos de proteína-anticuerpo de interés particular mediante la utilización de un reactivo (p. ej., un anticuerpo) marcado específico para el complejo de interés.

IX. Composiciones

Además, se proporcionan composiciones, p. ej., composiciones farmacéuticas, que contienen uno o más anticuerpos anti-CD40, o uno o más fragmentos de unión a antígeno de los mismos, tal como se describe en la presente memoria, formulados junto con un portador farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden incluir uno o una combinación de anticuerpos (p. ej., dos o más anticuerpos diferentes), o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas descritas en la presente memoria. Por ejemplo, una composición farmacéutica descrita en la presente memoria puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas) que se unen a diferentes epítomos en el antígeno diana o que presentan actividades complementarias.

En determinadas realizaciones, una composición comprende un anticuerpo anti-CD40 a una concentración de por lo menos 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml, 200 mg/ml, o a 1 a 300 mg/ml o 100 a 300 mg/ml.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria también pueden administrarse en terapia combinada, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia combinada puede incluir un anticuerpo anti-CD40 descrito en la presente memoria combinado con por lo menos otro agente anticáncer y/o agente estimulante de células T (p. ej., activador). Se describen ejemplos de agentes terapéuticos que se pueden utilizar en terapia combinada con mayor detalle posteriormente, en la sección sobre los usos de los anticuerpos descritos en la presente memoria.

En algunas realizaciones, las composiciones terapéuticas dadas a conocer en la presente memoria se pueden incluir otros compuestos, fármacos y/o agentes utilizados para el tratamiento del cáncer. Tales compuestos, fármacos y/o agentes pueden incluir, por ejemplo, fármacos de quimioterapia, fármacos de molécula pequeña o anticuerpos que estimulan la respuesta inmunitaria a un cáncer dado.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el portador resulta adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (p. ej., mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, el anticuerpo, inmunoconjugado, o molécula biespecífica, puede estar recubierto con un material para proteger el compuesto frente a la acción de ácidos y otras condiciones naturales que podrían inactivar el compuesto.

Los compuestos farmacéuticos descritos en la presente memoria pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto original y no imparte ningún efecto toxicológico no deseado (ver, p. ej., Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19). Entre los ejemplos de tales sales se incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Entre las sales de adición de ácido se incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como los ácidos clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosfórico y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos, tales como los ácidos mono- y dicarboxílico alifáticos, ácidos alcaicoicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcaicoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Entre las sales de adición de base se incluyen las derivadas de metales alcalino-térreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaina y similares.

Una composición farmacéutica descrita en la presente memoria también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Entre los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables se incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloreuro de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA, por sus siglas en inglés), hidroxitolueno butilado (BHT, por sus siglas en inglés), lecitina, galato de propilato, alfa-tocoferol y similares, y (3) agentes quelantes metálicos, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamín-tetraacético (EDTA, por sus siglas en inglés), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Entre los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden utilizarse en las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria se incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol,

polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como el aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como el oleato de etilo. Puede mantenerse la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante la utilización de un recubrimiento, tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse tanto mediante procedimientos de esterilización, *supra*, como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, ácido fenol-sórbico, y similares. También puede resultar deseable la inclusión de agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, puede conseguirse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

Entre los portadores farmacéuticamente aceptables se incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles, y polvos estériles, para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La utilización de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocida de la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se encuentra contemplada la utilización del mismo en las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria. Los compuestos activos suplementarios también pueden incorporarse en las composiciones.

Las composiciones terapéuticas normalmente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de preparación y almacenamiento. La composición puede formularse en forma de una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante la utilización de un recubrimiento, tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, resultará preferente la inclusión en la composición de agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse mediante la inclusión en la composición de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según resulte necesario, seguido de la esterilización por microfiltración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y el secado por congelación (liofilización), que producen unos polvos del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente esterilizada mediante filtración.

La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una sola forma de administración variará dependiendo del sujeto bajo tratamiento y del modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una sola forma de administración generalmente será la cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. En general, en porcentaje, esta cantidad estará comprendida entre aproximadamente el 0,01 por ciento y aproximadamente el noventa y nueve por ciento del ingrediente activo, preferentemente entre aproximadamente 0,1 por ciento y aproximadamente 70 por ciento, lo más preferentemente entre aproximadamente 1 % y aproximadamente 30 % de ingrediente activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (p. ej., una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un solo bolo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o incrementarse proporcionalmente según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Resulta especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de las dosis. La forma de la unidad de dosificación tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos que deben tratarse; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. Las especificaciones de las unidades de dosificación descritas en la presente memoria están dictadas y son directamente dependientes de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que debe alcanzarse, y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de la formación de compuestos, tales como un compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Para la administración del anticuerpo, los intervalos de dosis están comprendidos entre aproximadamente 0,0001 y 100 mg/kg, y más habitualmente entre 0,01 y 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o estar comprendidas en el intervalo de entre 1 y 10 mg/kg. Un régimen de tratamiento de

ejemplo implica la administración una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses.

En algunos métodos se administran dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso la dosis de cada anticuerpo administrado se encuentra comprendida dentro de los intervalos indicados. Un anticuerpo terapéutico generalmente se administra en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis únicas pueden ser, por ejemplo, semanales, mensuales, cada tres meses o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares, según indiquen las mediciones de niveles sanguíneos de los anticuerpos del antígeno diana en el paciente. En algunos métodos, se ajusta la dosis para alcanzar una concentración en plasma de anticuerpos de entre aproximadamente 1 y 1.000 µg/ml y en algunos métodos de entre aproximadamente 25 y 300 µg/ml.

Puede administrarse un anticuerpo en forma de una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la semivida más larga, seguidos de los anticuerpos humanizados, los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos no humanos. La dosificación y la frecuencia de la administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un período de tiempo prolongado. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de su vida. En aplicaciones terapéuticas, en ocasiones se requiere una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o termina, y preferentemente hasta que el paciente muestre una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de entonces, el paciente opcionalmente puede recibir la administración de un régimen profiláctico, aunque en muchas indicaciones inmunooncológicas no es necesario continuar el tratamiento.

Los niveles reales de dosificación de los principios activos en las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden variar de manera que se obtenga una cantidad del ingrediente activo que resulte eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración en particular, sin resultar tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad de las composiciones particulares descritas en la presente memoria que se utilicen, o el éster, la sal o la amida de los mismos, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto concreto que se utilice, la duración del tratamiento, otros medicamentos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, el estado, salud general y antecedentes médicos previos del paciente bajo tratamiento, y factores similares bien conocidos de la técnica médica.

Una "dosificación terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo anti-CD40 descrito en la presente memoria resulta preferentemente en una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los períodos libres de síntomas de la enfermedad, o una prevención del deterioro o discapacidad debido a la enfermedad. En el contexto del cáncer, una dosis terapéuticamente eficaz previene preferentemente un mayor deterioro de los síntomas físicos asociados al cáncer. Los síntomas del cáncer son bien conocidos de la técnica y entre ellos se incluyen, por ejemplo, características inusuales de un lunar, un cambio en la apariencia de un lunar, incluyendo asimetría, borde, color y/o diámetro, una zona de piel recién pigmentada, un lunar anormal, una zona oscura debajo de las uñas, bultos en los senos, cambios en un pezón, quistes en los senos, dolor en los senos, muerte, pérdida de peso, debilidad, fatiga excesiva, dificultad para comer, pérdida de apetito, tos crónica, empeoramiento de la dificultad para respirar, tos con sangre, sangre en la orina, sangre en las heces, náuseas, vómitos, metástasis hepática, metástasis pulmonares, metástasis óseas, sensación de plenitud abdominal, hinchazón, líquido en la cavidad peritoneal, sangrado vaginal, estreñimiento, distensión abdominal, perforación del colon, peritonitis aguda (infección, fiebre, dolor), dolor, vómito con sangre, sudoración excesiva, fiebre, presión arterial alta, anemia, diarrea, ictericia, mareo, escalofríos, espasmos musculares, metástasis en el colon, metástasis en los pulmones, metástasis en la vejiga, metástasis en el hígado, metástasis en los huesos, metástasis en los riñones, metástasis en el páncreas, dificultad para tragar, y similares. La eficacia terapéutica puede observarse inmediatamente después de la primera administración de un mAb anti-CD40hu agonista de la presente invención, u observarse solo después de un período de tiempo y/o una serie de dosis. Dicha eficacia retardada solo puede observarse después de varios meses de tratamiento, hasta 6, 9 o 12 meses. Es crítico no decidir prematuramente que un mAb anti-CD40hu agonista de la presente invención carece de eficacia terapéutica a la luz de la eficacia retardada mostrada por algunos agentes inmunooncológicos.

Una dosis terapéuticamente eficaz puede prevenir o retrasar la aparición del cáncer, tal como puede desearse cuando se presentan signos tempranos o preliminares de la enfermedad. Entre los ensayos de laboratorio utilizados en el diagnóstico del cáncer se incluyen compuestos químicos (incluyendo la medición de los niveles de CD40 o CD40L soluble) (Hock et al. (2006) Cáncer 106:2148; Chung y Lim (2014) J. Trans. Med. 12:102), hematología, serología y radiología. En consecuencia, cualquier ensayo clínico o bioquímico que realice un seguimiento de cualquiera de lo anterior puede utilizarse para determinar si un tratamiento en particular es una dosis terapéuticamente eficaz para el tratamiento del cáncer. El experto habitual en la materia será capaz de determinar dichas cantidades basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, y la composición particular o ruta de administración seleccionada.

Una composición descrita en la presente memoria puede administrarse mediante una o más vías de administración utilizando uno o más de una variedad de métodos conocidos de la técnica. Tal como apreciará el experto en la materia, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Entre las vías de administración preferentes para los anticuerpos descritos en la presente memoria se incluyen intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La expresión "administración parenteral" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluye, aunque sin limitación, la inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutáneo, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraspinal, epidural e intraesternal.

Alternativamente, un anticuerpo descrito en la presente memoria puede administrarse por una vía no parenteral, tal como una vía tópica, epidérmica o mucosa de administración, por ejemplo, intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

Los compuestos activos se pueden preparar con portadores que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por el experto en la materia. Ver, p. ej., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Las composiciones terapéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos de la técnica. Por ejemplo, en una realización preferente, una composición terapéutica descrita en la presente memoria puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos dados a conocer en las patentes US n.º 5.399.163, n.º 5.383.851, n.º 5.312.335, n.º 5.064.413, n.º 4.941.880, n.º 4.790.824 o n.º 4.596.556. Entre los ejemplos de implantes y módulos conocidos para la utilización con anticuerpos anti-CD40hu descritos en la presente memoria se incluyen: la patente US n.º 4.487.603, que da a conocer una bomba de microinfusión implantable para la dispensación de medicamentos a una tasa controlada; patente US n.º 4.486.194, que da a conocer un dispositivo terapéutico para la administración de medicamentos a través de la piel; la patente US n.º 4.447.233, que da a conocer una bomba de infusión de medicamentos para administrar medicamentos a una velocidad de infusión precisa; la patente US n.º 4.447.224, que da a conocer un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de medicamentos; la patente US n.º 4.439.196, que da a conocer un sistema osmótico de administración de fármacos con compartimentos multicámara y la patente US n.º 4.475.196, que da a conocer un sistema osmótico de administración de fármacos. Muchos otros implantes, sistemas de administración y módulos son conocidos por el experto en la materia.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD40hu descritos en la presente memoria pueden formularse para garantizar una distribución adecuada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHC) excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos. Para garantizar que los compuestos terapéuticos descritos en la presente memoria cruzan la BHC (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, ver, p. ej., las patentes US n.º 4.522.811, n.º 5.374.548 y n.º 5.399.331. Los liposomas pueden comprender una o más fracciones que son transportadas selectivamente hasta el interior de células u órganos específicos, mejorando de esta manera la administración dirigida de fármacos (ver, p. ej., V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685). Entre las fracciones diana de ejemplo se incluyen el folato o la biotina (ver, p. ej., la patente US n.º 5.416.016 de Low et al.); los manósidos (Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); los anticuerpos (P.G. Bloeman et al. (1995) FEES Lett. 357:140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); el receptor de la proteína surfactante A (Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233: 134); p120 (Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); ver también K. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) FEES Lett. 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

X. Usos y métodos

Los anticuerpos, las composiciones de anticuerpos y los métodos descritos en la presente memoria presentan numerosas utilidades *in vitro* e *in vivo* que implican, por ejemplo, el aumento de la respuesta inmunitaria mediante agonismo de la señalización de CD40. En una realización preferente, los anticuerpos descritos en la presente memoria son anticuerpos humanos o humanizados. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD40hu descritos en la presente memoria pueden administrarse a células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, p. ej., *in vivo*, para mejorar la inmunidad en una variedad de enfermedades. De acuerdo con lo anterior, en la presente memoria se proporcionan métodos para modificar una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprenden la administración al sujeto de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno de los mismos, descritos en la presente memoria de tal manera que la respuesta inmunitaria en el sujeto sea mejorada, estimulada o regulada positivamente.

Entre los sujetos preferentes se incluyen pacientes humanos en quienes resultaría deseable mejorar una respuesta

inmunitaria. Los métodos resultan particularmente adecuados para el tratamiento de pacientes humanos que presentan un trastorno que puede ser tratado potenciando la respuesta inmunitaria (p. ej., la respuesta inmunitaria mediada por células T). En una realización particular, los métodos resultan particularmente adecuados para el tratamiento del cáncer *in vivo*. Para conseguir un aumento de la inmunidad específica de antígeno, los anticuerpos anti-CD40hu descritos en la presente memoria pueden administrarse junto con un antígeno de interés o el antígeno puede estar ya presente en el sujeto que va a tratarse (p. ej., un sujeto portador de tumores o virus). Cuando se administran anticuerpos contra CD40 junto con otro agente, los dos pueden administrarse por separado o simultáneamente.

También se incluyen los métodos para detectar la presencia de antígeno CD40 humano en una muestra, o medir la cantidad de antígeno CD40 humano, que comprende poner en contacto la muestra, y una muestra control, con un anticuerpo monoclonal humano, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente al CD40 humano, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o fragmento del mismo y CD40 humano. La formación de un complejo se detecta entonces, en donde una diferencia de formación compleja entre la muestra en comparación con la muestra control es indicativa de la presencia de antígeno CD40 humano en la muestra. Además, los anticuerpos anti-CD40 descritos en la presente memoria se pueden utilizar para purificar CD40 humano a través de la purificación de inmuoafinidad.

Dada la capacidad de los anticuerpos anti-CD40hu descritos en la presente memoria para mejorar la coestimulación de las respuestas de las células T, p. ej., respuestas de células T específicas de antígeno, proporcionadas en la presente memoria son métodos *in vitro* e *in vivo* de utilización de los anticuerpos descritos en la presente memoria para estimular, potenciar o regular positivamente las respuestas de células T específicas de antígeno, p. ej., respuestas antitumorales de células T.

Las respuestas de células T CD4⁺ y CD8⁺ se pueden mejorar utilizando anticuerpos anti-CD40. Las células T pueden ser células T_{ef.}, p. ej., células T_{ef.} CD4⁺, células T_{ef.} CD8⁺, células T ayudantes (Th) y células T citotóxicas (Tc).

Se encuentran adicionalmente incluidos métodos para potenciar una respuesta inmunitaria (p. ej., una respuesta de células T específica de antígeno) en un sujeto que comprende la administración de un anticuerpo anti-CD40hu descrito en la presente memoria al sujeto de tal manera que se potencia la respuesta inmunitaria (p. ej., la respuesta de células T específicas de antígeno) en el sujeto. En una realización preferente, el sujeto es un sujeto portador de tumores y se mejora la respuesta inmunitaria contra el tumor. Un tumor puede ser un tumor sólido o un tumor líquido, p. ej., una neoplasia maligna hemática. En determinadas realizaciones, un tumor es un tumor inmunogénico. En determinadas realizaciones, un tumor es no inmunogénico. En determinadas realizaciones, un tumor es positivo para PD-L1. En determinadas realizaciones, un tumor es negativo para PD-L1. Un sujeto también puede ser un sujeto portador de virus y potenciarse la respuesta inmunitaria contra el virus.

Además, se proporcionan métodos para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto un anticuerpo anti-CD40hu descrito en la presente memoria de manera que se inhiba el crecimiento del tumor en el sujeto. También se proporcionan métodos para tratar la infección vírica crónica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo anti-CD40hu descrito en la presente memoria de manera que la infección vírica crónica sea tratada en el sujeto.

En determinadas realizaciones, se administra un anticuerpo anti-CD40hu a un sujeto a modo de terapia complementaria. Los tratamientos de sujetos que presentan cáncer con un anticuerpo anti-CD40hu pueden conducir a una respuesta duradera a largo plazo en relación con los tratamientos de referencia actuales; supervivencia a largo plazo de por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 10 o más años, supervivencia libre de recurrencia de por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, o 10 o más años. En determinadas realizaciones, el tratamiento de un sujeto que presenta cáncer con un anticuerpo anti-CD40hu previene la recurrencia del cáncer o retrasa la recurrencia del cáncer durante, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, o 10 o más años. Se puede utilizar un tratamiento anti-CD40 a modo de línea de tratamiento primaria o secundaria.

Estos y otros métodos descritos en la presente memoria se discuten en mayor detalle posteriormente.

Cáncer

En la presente memoria se proporcionan métodos para tratar a un sujeto que presenta cáncer, que comprenden la administración al sujeto de un anticuerpo anti-CD40hu descrito en la presente memoria, de manera que el sujeto sea tratado, p. ej., de tal manera que el crecimiento de tumores cancerosos resulte inhibido o reducido, y/o que se produzca la regresión de los tumores. Puede utilizarse un anticuerpo anti-CD40hu solo para inhibir el crecimiento de los tumores cancerosos. Alternativamente, se puede utilizar un anticuerpo anti-CD40hu junto con otro agente, p. ej., otros agentes inmunogénicos, tratamientos estándares para el cáncer u otros anticuerpos, tal como se describe a continuación.

En consecuencia, en la presente memoria se proporcionan métodos para tratar el cáncer, p. ej., mediante la inhibición del crecimiento de las células tumorales en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40hu descrito en la presente memoria, o fragmento de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD40hu humanizado, un anticuerpo anti-CD40hu

químérico humano, o un anticuerpo anti-CD40hu humanizado no humano, p. ej., un anticuerpo humano, químérico o humanizado anti-CD40hu que compite por unirse o que se une al mismo epítipo que por lo menos uno de los anticuerpos anti-CD40hu específicamente descritos en la presente memoria.

Entre los cánceres cuyo crecimiento puede inhibirse utilizando los anticuerpos de la invención se incluyen cánceres que suelen responder a la inmunoterapia. Entre los ejemplos no limitativos de cánceres para tratamiento se incluyen carcinoma de células escamosas, cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer pulmonar de células no pequeñas escamosas (NSCLC, por sus siglas en inglés), no NSCLC, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer renal (p. ej., carcinoma de células claras), cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón (p. ej., carcinoma de células renales (CCR)), cáncer de próstata (p. ej., adenocarcinoma de próstata refractario a hormonas), cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma (glioblastoma multiforme), cáncer cervical, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer (o carcinoma) de cabeza y cuello, cáncer gástrico, tumor de células germinales, sarcoma pediátrico, células asesinas naturales sinonasal, melanoma (p. ej., melanoma maligno metastásico, tal como melanoma maligno cutáneo o intraocular), cáncer óseo, cáncer de piel, cáncer de útero, cáncer de la región anal, cáncer testicular, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma de endometrio, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de vagina, carcinoma de vulva, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer de sistema endocrino, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de uretra, cáncer de pene, tumores sólidos de la infancia, cáncer de uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de células T, cánceres inducidos medioambientalmente, incluidos los inducidos por amianto, cánceres relacionados con la infección vírica (p. ej., tumor relacionado con el virus del papiloma humano (VPH), y neoplasias hemáticas derivadas de cualquiera de los dos linajes principales de células sanguíneas, es decir, línea celular mieloide (que produce granulocitos, eritrocitos, trombocitos, macrófagos y mastocitos) o la línea celular linfoide (que produce células B, T y NK, y células plasmáticas), tales como todos los tipos de leucemia, linfoma y mieloma, p. ej., leucemias agudas, crónicas, linfocíticas y/o mielógenas, tales como leucemia aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (LLC) y leucemia mielógena crónica (LMC), LMA indiferenciada (M0), leucemia mieloblástica (M1), leucemia mieloblástica (M2, con maduración celular), leucemia promielocítica (variante M3 o M3 [M3V]), leucemia mielomonocítica (variante M4 o M4 con eosinofilia [M4E]), leucemia monocítica (M5), eritroleucemia (M6), leucemia megacarioblástica (M7), sarcoma granulocítico aislado, y cloroma; linfomas, tales como linfoma de Hodgkin (LH), el linfoma no Hodgkin (LNH), linfomas de células B, linfomas de células T, linfoma linfoplasmacitoide, linfoma monocitoide de células B, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (LTAM), linfoma de células grandes anaplásico (p. ej., Ki 1+), linfoma-leucemia de células T adultas, linfoma de células del manto, linfoma de células T angioinmunoblástico, linfoma angiocéntrico, linfoma intestinal de células T, linfoma mediastínico primario de células B, linfoma linfoblástico de células T precursoras, linfoma linfoblástico, trastorno linfoproliferativo post-transplante, linfoma histiocítico verdadero, linfoma primario del sistema nervioso central, linfoma primario de efusión, linfoma linfoblástico (LBL), tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, leucemia linfoblástica aguda, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de Burkitt, linfoma folicular, linfoma histiocítico difuso (LHD), linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma linfoplasmacitoide (LLP) con macroglobulinemia de Waldenström; mielomas, tal como mieloma de IgG, mieloma de cadena ligera, mieloma no secretor, mieloma latente (también llamado mieloma indolente), plasmocitoma solitario y múltiples mielomas, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma de células pilosas; tumores hematopoyéticos de origen mieloide, tumores de origen mesenquimal, incluyendo fibrosarcoma y rabdomiosarcoma; seminoma, teratocarcinoma, tumores de los sistemas nerviosos central y periférico, incluyendo astrocitoma y schwannomas; tumores de origen mesenquimal, incluyendo fibrosarcoma, rabdomiosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xeroderma pigmentoso, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular tiroideo y teratocarcinoma, tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, por ejemplo, tumores de células T y de células B, incluyendo, aunque sin limitación, trastornos de células T, tales como la leucemia prolinfocítica T (LPL-T), incluyendo los de tipo microcítico y de células cerebriformes; leucemia de linfocitos granulares grandes (LGL) preferentemente del tipo de células T; linfoma hepatosplénico de células T; linfoma periférico/postímico de células T (subtipos pleomórficos e inmunoblásticos); linfoma angiocéntrico (nasal) de células T; cáncer de cabeza o cuello, cáncer renal, cáncer de recto, cáncer de la glándula tiroides; linfoma mieloide agudo, así como cualesquiera combinaciones de dichos cánceres. Los métodos descritos en la presente memoria también pueden utilizarse para el tratamiento de cánceres metastásicos, cánceres refractarios (p. ej., cánceres refractarios a inmunoterapia previa, p. ej., con un anticuerpo bloqueante de CTLA-4 o PD-1), y los cánceres recurrentes.

Puede administrarse un anticuerpo anti-CD40hu como monoterapia, o como la única terapia de inmunoestimulación, o puede combinarse con un agente inmunogénico en una estrategia de vacuna contra el cáncer, tal como células cancerosas, antígenos tumorales purificados (incluyendo proteínas recombinantes, péptidos y moléculas de carbohidratos), y células transfectadas con genes codificantes de citoquinas inmunoestimulantes (He et al. (2004), J. Immunol. 173:4919-28). Entre los ejemplos no limitativos de vacunas tumorales que se pueden usar se incluyen péptidos de antígenos de melanoma, tales como péptidos gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 y/o tirosinasa, o células tumorales transfectadas para expresar la citoquina GM-CSF. Se han concebido muchas estrategias experimentales para la vacunación contra los tumores (ver Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738; ver

también Restifo, N. and Sznol, M., *Cancer Vaccines*, capítulo 61, páginas 3023-3043 en DeVita et al. (editores), 1997, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, quinta edición). En una de estas estrategias, se prepara una vacuna utilizando células tumorales autólogas o alogénicas. Estas vacunas celulares han demostrado ser más eficaces cuando las células tumorales se transducen para expresar GM-CSF. Se ha demostrado que GM-CSF es un potente activador de la presentación de antígenos para la vacunación tumoral. Dranoff et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 90: 3539-43.

El estudio de la expresión génica y los patrones de expresión génica a gran escala en diversos tumores han llevado a la definición de los llamados antígenos específicos tumorales. Rosenberg, S A (1999) *Immunity* 10: 281-7. En muchos casos, estos antígenos específicos tumorales son antígenos de diferenciación expresados en los tumores y en la célula de la que surgió el tumor, por ejemplo, antígenos de melanocitos gp100, antígenos MAGE y Trp-2. Lo que es más importante, muchos de dichos antígenos pueden ser las dianas de las células T específicas tumorales que se encuentran en el huésped. Los agonistas de CD40 se pueden utilizar conjuntamente con una colección de proteínas recombinantes y/o péptidos expresados en un tumor para generar una respuesta inmunitaria contra estas proteínas. Estas proteínas son normalmente detectadas por el sistema inmunitario como antígenos propios y por lo tanto las tolera. El antígeno tumoral puede incluir la proteína telomerasa, que es necesaria para la síntesis de telómeros de cromosomas y que se expresa en más del 85 % de los cánceres humanos y en solo un número limitado de tejidos somáticos (Kim et al. (1994) *Science* 266: 2011-2013). Los antígenos tumorales también pueden ser "neoantígenos" expresados en células cancerosas debido a mutaciones somáticas que alteran la secuencia de proteínas o crean proteínas de fusión entre dos secuencias no relacionadas (es decir, bcr-abl en el cromosoma Philadelphia), o idiotipo de tumores de células B.

Entre otras vacunas tumorales pueden incluirse las proteínas de los virus implicados en cánceres humanos, tales como los virus del papiloma humano (VPH), los virus de la hepatitis (VHB y VHC) y el virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi (VHSK). Otra forma de antígeno específico tumoral que se puede utilizar junto con la inhibición de CD40 son las proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés) purificadas y aisladas del tejido tumoral en sí. Estas proteínas de choque térmico contienen fragmentos de proteínas de las células tumorales y estas HSP son altamente eficientes en el transporte a las células presentadoras de antígenos para inducir inmunidad tumoral (Suot y Srivastava (1995) *Science* 269:1585-1588; Tamura et al. (1997) *Science* 278:117-120).

Las células dendríticas (CD) son potentes células presentadoras de antígenos que pueden usarse para iniciar respuestas específicas de antígeno. Las CD pueden producirse *ex vivo* y cargarse con diversos antígenos proteicos y peptídicos, así como extractos de células tumorales (Nestle et al. (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). Las CD también pueden ser transducidas por medios genéticos para expresar también estos antígenos tumorales. Las CD también han sido fusionadas directamente a las células tumorales con fines de inmunización (Kugler et al. (2000) *Nature Medicine* 6:332-336). Como método de vacunación, la inmunización con CD se puede combinar eficazmente con el agonismo de CD40 para activar (desencadenar) respuestas antitumorales más potentes.

El agonismo de CD40 también se puede combinar con tratamientos de referencia para el cáncer (p. ej., cirugía, radiación y quimioterapia). El agonismo de CD40 puede combinarse eficazmente con regímenes quimioterapéuticos. En estos casos, puede ser posible reducir la dosis de reactivo quimioterapéutico administrado (Mokyr et al. (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Un ejemplo de tal combinación es un anticuerpo anti-CD40hu en combinación con decarbazina para el tratamiento del melanoma. Otro ejemplo de tal combinación es un anticuerpo anti-CD40hu en combinación con interleuquina-2 (IL-2) para el tratamiento del melanoma. La justificación científica del uso combinado de agonistas de CD40 y la quimioterapia es que la muerte celular, que es una consecuencia de la acción citotóxica de la mayoría de los compuestos quimioterapéuticos, debe dar lugar a niveles incrementados de antígeno tumoral en la ruta de la presentación de antígenos. Otras terapias combinadas que pueden resultar en sinergia con el agonismo de CD40 a través de la muerte celular son la radiación, la cirugía y la privación hormonal. Cada uno de estos protocolos crea una fuente de antígeno tumoral en el huésped. Los inhibidores de la angiogénesis también se pueden combinar con agonistas de CD40. La inhibición de la angiogénesis conduce a la muerte celular tumoral que puede alimentar el antígeno tumoral a las vías del huésped de presentación de antígenos.

Los anticuerpos anti-CD40hu descritos en la presente memoria también se pueden usar en combinación con anticuerpos biespecíficos que dirigen las células efectoras que expresan receptores de Fc α o Fc γ a células tumorales (ver, p. ej., las patentes US n.º 5.922.845yn.º 5.837.243). Los anticuerpos biespecíficos se pueden usar para atacar dos antígenos separados. Por ejemplo, se han utilizado anticuerpos biespecíficos anti-receptor de Fc/anti-antígeno tumoral (p. ej., Her-2/neu) para dirigir macrófagos a los sitios tumorales. Este direccionamiento puede activar más eficazmente las respuestas específicas de tumor. El brazo de células T de estas respuestas podría potenciarse mediante el agonismo de CD40. Alternativamente, el antígeno puede administrarse directamente a las CD mediante el uso de anticuerpos biespecíficos que se unen al antígeno tumoral y a un marcador de superficie celular específico de la célula dendrítica.

Los tumores evaden la vigilancia inmunitaria del huésped mediante una gran variedad de mecanismos. Muchos de estos mecanismos pueden ser superados por la inactivación de proteínas inmunosupresoras expresadas por los tumores. Entre ellos se incluyen TGF- β (Kehrl et al. (1986) *J Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard y O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200), y ligando de Fas (Hahne et al. (1996) *Science* 274: 1363-1365)). Los

anticuerpos contra cada una de dichas entidades se pueden utilizar en combinación con anticuerpos anti-CD40hu para contrarrestar los efectos del agente inmunosupresor y favorecer las respuestas inmunitarias tumorales del huésped.

Los anticuerpos anti-CD40 son capaces de sustituir eficazmente la actividad de las células T ayudantes. Ridge et al. (1998) Nature 393: 474-478. La activación de los anticuerpos contra moléculas cosestimuladoras de las células T, tales como CTLA-4 (p. ej., patente US n.º 5.811.097), OX-40 (Weinberg et al. (2000) Immunol 164: 2160-2169), CD137/4-1BB (Melero et al. (1997) Nature Medicine 3: 682-685 (1997) e ICOS (Hutloff et al. (1999) Nature 397: 262-266) también puede proporcionar niveles incrementados de activación de las células T. También pueden utilizarse inhibidores de PD1 o PD-L1 junto con anticuerpos anti-CD40hu.

También existen varios protocolos de tratamiento experimental que implican la activación *ex vivo* y la expansión de células T específicas de antígeno y la transferencia adoptiva de estas células a los receptores con el fin de estimular células T específicas de antígeno contra el tumor (Greenberg y Riddell (1999) Science 285: 546-51). Estos métodos también se pueden utilizar para activar las respuestas de células T contra agentes infecciosos tales como el CMV. La activación *ex vivo* en presencia de anticuerpos anti-CD40 puede incrementar la frecuencia y la actividad de las células T transferidas adoptivamente.

Infecciones víricas crónicas

En otro aspecto, la invención descrita en la presente memoria proporciona un método de tratamiento de una enfermedad infecciosa en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de un anticuerpo anti-CD40hu, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de tal manera que el sujeto es tratado para la enfermedad infecciosa.

De manera similar a su aplicación en los tumores tal como se ha discutido anteriormente, el agonismo de CD40 mediado por anticuerpos puede usarse por sí solo, o como un adyuvante, en combinación con vacunas, para potenciar la respuesta inmunitaria contra patógenos, toxinas y autoantígenos. Entre los ejemplos de patógenos para los que este enfoque terapéutico puede resultar particularmente útil se incluyen los patógenos para los que actualmente no existe una vacuna eficaz, o los patógenos para los que las vacunas convencionales no son completamente eficaces. Entre ellos se incluyen, aunque sin limitación, VIH, hepatitis (A, B y C), Influenza, herpes, *Giardia*, *Malaria*, *Leishmania*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. El agonismo de CD40 resulta particularmente útil contra las infecciones establecidas por agentes tales como VIH que presentan antígenos alterados durante el curso de las infecciones. Estos nuevos epítomos son reconocidos como foráneos en el momento de la administración de anticuerpos anti-CD40 humanos, provocando de esta manera una fuerte respuesta de células T.

Entre algunos ejemplos de virus patógenos que causan infecciones tratables mediante los métodos descritos en la presente memoria se incluyen VIH, hepatitis (A, B o C), virus herpes (p. ej., VVZ, VHS-1, VHH-6, VHS-II, CMV y virus de Epstein Barr), adenovirus, virus de la influenza, flavivirus, ecovirus, rinovirus, virus coxsackie, coronavirus, virus respiratorio sincitial, virus de la parotiditis, rotavirus, virus del sarampión, virus de la rubéola, parvovirus, virus de la vaccinia, virus HTLV, virus dengue, virus del papiloma, virus del molusco, poliovirus, virus de la rabia, virus JC y virus de la encefalitis arbovítica.

Entre algunos ejemplos de bacterias patógenas que causan infecciones tratables mediante los métodos descritos en la presente memoria se incluyen *Chlamydia*, bacterias rickettsiales, micobacterias, estafilococos, estreptococos, neumococos, meningococos y gonococos, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Legionella*, *Diphtheria*, *Salmonella*, bacilos, *Cholera*, tétanos, botulismo, ántrax, peste, leptospirosis y bacteria de la enfermedad de Lyme.

Entre algunos ejemplos de hongos patógenos que causan infecciones tratables mediante los métodos descritos en la presente memoria se incluyen *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis*, etc.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, etc.), género *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*.

Entre algunos ejemplos de parásitos patógenos causantes de infecciones tratables mediante los métodos descritos en la presente memoria se incluyen *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* y *Nippostrongylus brasiliensis*.

En todos los métodos anteriormente proporcionados, puede combinarse el agonismo de CD40 con otras formas de inmunoterapia, tales como el tratamiento con citoquinas (p. ej., interferones, GM-CSF, G-CSF e IL-2), o terapia de anticuerpos biespecíficos, que proporciona una presentación mejorada de antígenos tumorales. Ver, p. ej., Holliger (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 90:6444-6448; Poljak (1994) Structure 2:1121-1123.

Adyuvantes de vacunas

Los anticuerpos anti-CD40hu descritos en la presente memoria se pueden utilizar para potenciar las respuestas inmunitarias específicas de antígeno mediante la administración conjunta de un anticuerpo anti-CD40hu con un antígeno de interés, p. ej., una vacuna. De acuerdo con lo anterior, en la presente memoria se proporcionan métodos

para potenciar la respuesta inmunitaria a un antígeno en un sujeto, que comprenden la administración al sujeto de: (i) el antígeno; y (ii) un anticuerpo anti-CD40hu, o fragmento del mismo que se une al antígeno, de tal manera que se potencia la respuesta inmunitaria contra el antígeno en el sujeto. El antígeno puede ser, por ejemplo, un antígeno tumoral, un antígeno vírico, un antígeno bacteriano o un antígeno de un patógeno. Entre los ejemplos no limitativos de tales antígenos se incluyen los discutidos en las secciones anteriores, tales como los antígenos tumorales (o vacunas tumorales) discutidas anteriormente, o los antígenos de los virus, bacterias u otros patógenos indicados anteriormente.

Las vías adecuadas de administración de las composiciones de anticuerpos (p. ej., anticuerpos monoclonales humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) descritos en la presente memoria *in vivo* e *in vitro* son bien conocidas de la técnica y pueden ser seleccionadas por el experto habitual en la materia. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpos pueden administrarse mediante inyección (p. ej., intravenosa o subcutánea). Las dosis adecuadas de las moléculas utilizadas dependerán de la edad y el peso del sujeto y de la concentración y/o formulación de la composición de anticuerpos.

Tal como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos anti-CD40hu descritos en la presente memoria pueden administrarse conjuntamente con uno o más otros agentes terapéuticos, p. ej., un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. El anticuerpo se puede unir al agente (en forma de complejo inmunitario) o se puede administrar por separado del agente. En este último caso (administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después o simultáneamente con el agente o puede administrarse conjuntamente con otras terapias conocidas, p. ej., una terapia anticáncer, p. ej., radiación. Entre tales agentes terapéuticos se incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como la doxorrubicina (adriamicina), el cisplatino, el sulfato de bleomicina, la carmustina, el clorambucilo, la dacarbazina, la ciclofosfamida y la hidroxiurea que, por sí solos, solo resultan eficaces a niveles tóxicos o subtóxicos para el paciente. El cisplatino se administra por vía intravenosa en forma de una dosis de 100 mg/ml una vez cada cuatro semanas y la adriamicina se administra por vía intravenosa en forma de una dosis de 60 a 75 mg/ml una vez cada 21 días. La administración conjunta de anticuerpos anti-CD40, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, descritos en la presente memoria con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes anticáncer que operan a través de diferentes mecanismos, produciendo un efecto citotóxico para las células tumorales humanas. Dicha coadministración puede resolver problemas debidos al desarrollo de resistencia a fármacos o a un cambio en la antigenicidad de las células tumorales que las haría no reactivas con el anticuerpo.

El anticuerpo de la invención puede proporcionarse en kits que comprenden las composiciones de anticuerpos descritas en la presente memoria (p. ej., anticuerpos humanos, moléculas biespecíficas o multiespecíficas, o inmunoconjugados) e instrucciones de uso. El kit puede contener, además, por lo menos un reactivo adicional, o uno o más anticuerpos humanos adicionales descritos en la presente memoria (p. ej., un anticuerpo humano que presenta una actividad complementaria que se une a un epítipo en el antígeno CD40 distinto del primer anticuerpo humano). Los kits normalmente incluyen una etiqueta que indica el uso previsto del contenido del kit. El término etiqueta incluye cualquier material escrito o grabado suministrado sobre el kit o con el kit, o que de otro modo acompaña al kit.

Terapias combinadas

Además de las terapias combinadas que se han proporcionado anteriormente, los anticuerpos anti-CD40 descritos en la presente memoria también se pueden usar en terapia combinada, p. ej., para el tratamiento del cáncer, tal como se describe posteriormente.

La presente invención proporciona métodos de terapia combinada en los que se coadministra un anticuerpo anti-CD40hu con uno o más agentes adicionales, p. ej., anticuerpos, que resultan eficaces para estimular las respuestas inmunitarias, para de esta manera potenciar, estimular o regular positivamente las respuestas inmunitarias en un sujeto.

Generalmente, un anticuerpo anti-CD40hu descrito en la presente memoria puede combinarse con (i) un agonista de otro receptor coestimulador y/o (ii) un antagonista de una señal inhibitoria en las células T, cualquiera de los cuales resulta en la amplificación de las respuestas de células T específicas de antígeno (reguladores de punto de control inmunitario). La mayoría de las moléculas coestimuladoras y coinhibidoras son miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF), y los anticuerpos anti-CD40 descritos en la presente memoria pueden administrarse con un agente que presenta como diana un miembro de la familia IgSF a fin de incrementar la respuesta inmunitaria. Una familia importante de ligandos unidos a membrana que se unen a receptores coestimuladores o coinhibidores es la familia B7, que incluye B7-1, B7-2, B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA) y B7-H6. Otra familia de ligandos unidos a membrana que se unen a receptores coestimuladores o coinhibidores es la familia de moléculas TNF que se unen a miembros de la familia de receptores de TNF afines, entre los que se incluyen CD40 y CD40L, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD40L y CD40L. CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137/4-1BB, TRAIL/APO2-L, TRAILR1/DR4, TRAIL, R2/DRS, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/FN14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LT β R, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDAR, EDA1, XEDAR, EDA2, TNFR1, linfotóxina α /TNF β , TNFR2, TNF α , LT β R, linfotóxina α 1 β 2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY, NGFR (ver, p. ej., Tansey (2009) Drug Discovery Today 00:1).

En otro aspecto, los anticuerpos anti-CD40hu se pueden utilizar en combinación con antagonistas de citoquinas que inhiben la activación de las células T (p. ej., IL-6, IL-10, TGF- β , VEGF; u otras "citoquinas inmunosupresoras", o citoquinas que estimulan la activación de las células T, para estimular una respuesta inmunitaria, p. ej., para el tratamiento de enfermedades proliferativas, tales como el cáncer.

Los anticuerpos anti-CD40hu agonistas y las terapias combinadas de anticuerpos descritas en la presente memoria también se pueden utilizar junto con otras terapias bien conocidas que se seleccionan por su utilidad particular contra la indicación que se está tratando (p. ej., cáncer). Las combinaciones de los anticuerpos anti-CD40hu agonistas descritos en la presente memoria pueden usarse secuencialmente con uno o más agentes farmacéuticamente aceptables conocidos.

Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD40hu agonistas y las terapias combinadas de anticuerpos descritas en la presente memoria se pueden utilizar en combinación (p. ej., simultáneamente o por separado) con un tratamiento adicional, tal como irradiación, quimioterapia (p. ej., utilizando camptotecina (CPT-11), 5-fluorouracilo (5-FU), cisplatino, doxorubicina, irinotecán, paclitaxel, gemcitabina, cisplatino, paclitaxel, carboplatino-paclitaxel (Taxol), doxorubicina, 5-fu, o camptotecina + apo2/TRAIL (una combinación 6X)), uno o más inhibidores del proteasoma (p. ej., bortezomib o MG132) 101, uno o más inhibidores de la Bcl-2263 15-070 o antagonistas de MCL-1 (proteína de diferenciación de células de leucemia mieloide-1), antagonistas de IAP (inhibidor de la proteína de apoptosis) (p. ej., smac7, smac4, mimético de smac de molécula pequeña, péptidos smac sintéticos (ver Fulda et al., Nat. Med. 640,8:808-15), IS23722 (LY2181308), o AEG-35156 (GEM-640)), inhibidores de HDAC (histona desacetilasa), anticuerpos anti-CD20 (p. ej., rituximab), inhibidores de la angiogénesis (p. ej., bevacizumab), agentes antiangiogénicos con diana en VEGF y VEGFR (p. ej., AVASTIN®), triterpenoides sintéticos (ver Hyer et al., Cancer Research 2005;65:4799-808), c-FLIP (proteína inhibitoria de FLICE celular) (p. ej., ligandos naturales y sintéticos de PPAR γ (receptor γ activado por el proliferador de peroxisoma), 5809354 o 5569100), inhibidores de quinasa (p. ej., sorafenib), trastuzumab, cetuximab, temsirolimus, inhibidores de mTOR, tales como rapamicina y temsirolimus, bortezomib, inhibidores de JAK2, inhibidores de HSP90, inhibidores de PI3K-AKT, lenalidomida, inhibidores de GSK3 β , inhibidores de IAP y/o fármacos genotóxicos.

Los anticuerpos anti-CD40hu agonistas y las terapias combinadas de anticuerpos descritas en la presente memoria pueden utilizarse además en combinación con uno o más agentes citotóxicos antiproliferativos. Entre las clases de compuestos que se pueden utilizar como agentes citotóxicos antiproliferativos se incluyen, aunque sin limitación, los siguientes:

agentes alquilantes (incluyendo, aunque sin limitación, mostazas nitrogenadas, derivados de etilenimina, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas y triazenos): mostaza uracilo, clormetina, ciclofosfamida (CYTOXAN™), fosfamida, melfalán, clorambucilo, pipobromán, trietilenmelamina, trietilenfosforamina, busulfán, carmustina, lomustina, estreptozocina, dacarbazina y temozolomida.

Antimetabolitos (incluyendo, aunque sin limitación, antagonistas del ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de la adenosina desaminasa): Metotrexato, 5-fluorouracilo, floxuridina, citarabina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, fosfato de fludarabina, pentostatina y gemcitabina.

Entre los agentes antiproliferativos adecuados para combinar con anticuerpos anti-CD40hu agonistas se incluyen, aunque sin limitación, taxanos, paclitaxel (el paclitaxel está disponible comercialmente como TAXOL™), docetaxel, discodermolida (DDM), dictioestatina (DCT), pelorusida A, epotilona, epotilona A, epotilona B, epotilona C, epotilona D, epotilona E, epotilona F, furanoepotilona D, desoxiepotilona BI, [17]-deshidrodesoxiepotilona B, [18]deshidrodesoxiepotilonas B, C12,13-ciclopropil-epotilona A, epotilona A con puente C6-C8, trans-9,10-deshidroepotilona D, cis-9,10-deshidroepotilona D, 16-desmetilepotilona B, epotilona B10, discoderomolida, patupilona (EPO-906), KOS-862, KOS-1584, ZK-EPO, ABJ-789, XAA296A (discodermolida), TZT-1027 (soblidotina), ILX-651 (hidrocloruro de tasidotina), halicondrina B, mesilato de eribulina (E-7389), hemiasterlina (HTI-286), E-7974, criptoficinas, LY-355703, inmunoconjugados de maitansinoides (DM-1), MKC-1, ABT-751, T1-38067, T-900607, SB-715992 (ispinesib), SB-743921, MK-0731, STA-5312, eleuterobina, 17beta-acetoxi-2-etoxi-6-oxo-B-homo-estra-1,3,5(10)-trién-3-ol, ciclostreptina, isolaulimálide, laulimálide, 4-epi-7-deshidroxi-14,16-didemetil-(+)-discodermolidas, y criptotilona 1, además de otros agentes estabilizadores de la microtubulina conocidos de la técnica.

En los casos en los que resulte deseable hacer que las células proliferativas aberrantemente estén quiescentes junto con o antes del tratamiento con los anticuerpos anti-CD40hu agonistas descritos en la presente memoria, también pueden administrarse al paciente hormonas y esteroides (incluidos los análogos sintéticos), tales como 17 α -etinilestradiol, dietilestilbestrol, testosterona, prednisona, fluoximesterona, propionato de dromostanolona, testolactona, megestrolacetato, metilprednisolona, metil-testosterona, prednisolona, triamcinolona, clorotrianiseno, hidroxiprogesterona, aminoglutetimida, estramustina, medroxiprogesteroneacetato, leuprolida, flutamida, toremifeno, ZOLADEX™. Al utilizar los métodos o composiciones descritos en la presente memoria, también se pueden administrar según se desee otros agentes utilizados en la modulación del crecimiento tumoral o la metástasis en un entorno clínico, tales como los antimimeticos.

Los métodos para la administración segura y eficaz de agentes quimioterapéuticos son conocidos por el experto en la

materia. Además, su administración se describe en la literatura de referencia. Por ejemplo, la administración de muchos de los agentes quimioterapéuticos se describe en: Physicians' Desk Reference (PDR), p. ej., edición de 1996 (Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, EE.UU.).

El agente o agentes quimioterapéuticos y/o radioterapia pueden administrarse de acuerdo con protocolos terapéuticos bien conocidos de la técnica. Resultará evidente para el experto en la materia que la administración del agente o agentes quimioterapéuticos o la radioterapia puede variar dependiendo de la enfermedad que se esté tratando y de los efectos conocidos del agente quimioterapéutico o radioterapia sobre esa enfermedad. Además, de acuerdo con el conocimiento del médico cualificado, los protocolos terapéuticos (p. ej., los niveles de dosis y los tiempos de administración) pueden variar en vista de los efectos observados de los agentes terapéuticos administrados al paciente, y en vista de las respuestas observadas de la enfermedad frente a los agentes terapéuticos administrados.

La presente exposición se ilustra en mayor detalle en los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como adicionalmente limitativos.

Ejemplos

EJEMPLO 1

Generación de ratones CD40/FcγR humanizados

Para generar un modelo preciso y eficiente que pueda evaluar fácilmente la actividad de las Fc variantes anti-CD40 humana y permitir la selección de un candidato clínico optimizado, los presentes inventores generaron un modelo de ratón único humanizado para CD40 y los FcγR. En primer lugar, se generaron ratones CD40 humanizados sobre un fondo de ratón deficiente en CD40. Se evaluó el patrón de expresión del transgén BAC del CD40 humano en diferentes poblaciones de células inmunitarias en estos ratones y se encontró que la expresión humana de CD40 en células B sanguíneas, células dendríticas, monocitos y macrófagos, pero no en las poblaciones de células T, neutrófilos y células NK era similar al patrón observado en las células humanas y sus ortólogos de ratón (FIG. 1A).

La funcionalidad del transgén CD40hu en estos ratones, se verificó mediante la evaluación de la formación de centros germinales (CG), un proceso que requiere la señalización de CD40 (Basso et al. (2004) Blood 104, 4088-4096). Mientras que los ratones CD40^{-/-} perdieron la capacidad de formar un CG, este fenotipo fue restaurado por la introducción del transgén CD40hu (FIG. 1B) mediada por la interacción de CD40hu con el ligando de CD40 de ratón, que presenta una cinética de unión y afinidad similares con el ligando de CD40 humano (FIG. 2). Los ratones CD40^{-/-} presentaban una respuesta de IgG específica del antígeno deficiente en el momento de la inmunización, que fue restaurada tras la introducción del transgén CD40hu (FIG. 1C), confirmando que el transgén CD40hu complementa funcionalmente la deficiencia de CD40 en el ratón. Juntos, estos datos demuestran que los ratones CD40 humanizados recapitulan el patrón de expresión y la función del gen humano. Para generar un modelo de ratón en el que se pudiesen evaluar las IgG agonistas totalmente humanas contra CD40 humano, se cruzaron estos ratones CD40 humanizados con los ratones FcγR humanizados previamente descritos (caracterizados en detalle en (DiLillo y Ravetch (2015) Cell 161, 1035-1045; Smith et al., 2012 PNAS (USA) 109, 6181-6186), resultando en una cepa de ratones que expresaba CD40 humano y las cadenas alfa de los genes FCGR1A, FCGR2AR131, FCGR2BI232, FCRG3AF158 y FCGR3B bajo el control de sus elementos reguladores humanos endógenos en un fondo isogénico con eliminación de los genes homólogos del ratón.

Los ratones FcγRanull presentan una delección de la cadena FcγRα de Fcgr2b, Fcgr3 y Fcgr4, y se cruzaron con ratones FcγRI^{-/-} (Barnes et al., 2002 Immunity 16, 379-389. Se generaron en un fondo C57BL/6 y se caracterizaron tal como se ha descrito anteriormente (Smith, et al. (2012) PHAS USA 109, 6181-6186). Los ratones FcγR humanizados (FcγRanull, hFcγRI⁺, FcγRIIA^{R131+}, FcγRIIB⁺, FcγRIIIA^{F158+} y FcγRIIIB⁺) se generaron y caracterizaron extensamente tal como se ha descrito anteriormente (Smith, et al. (2012) PNAS (USA) 109, 6181-6186). Se generaron ratones transgénicos CD40 humanos sobre un fondo genético C57BL/6 mediante inyección pronuclear de ADN BAC RP11-177B15 linealizado (Osoegawa, et al. (2001) Genome Research 11, 483-496) y fueron apareados con ratones con inactivación de CD40 (*knockout*) ("CD40^{-/-}") (The Jackson Laboratory), obteniendo ratones CD40^{-/-}CD40hu^{+/+}. Los ratones CD40^{-/-}CD40hu^{+/+} se aparearon con ratones FcγR humanizados, obteniendo ratones CD40 y FcγR humanizados (denominados "CD40hu/FcγR") que contenían el genotipo CD40^{-/-}CD40hu⁺ Fcgr1^{-/-} Fcgr2^{-/-} Fcgr3^{-/-} Fcgr4^{-/-} FcγRIhu⁺ FcγRIIAhu⁺ FcγRIIBhu⁺ FcγRIIIAhu⁺ FcγRIIIBhu⁺. Los ratones CD40hu/FcγRIIBhu⁺/FcγRIIAhu⁺ y CD40hu/FcγRIIBhu⁺/FcγRIIAhu⁺ descritos en la figura 4D fueron obtenidos durante el apareamiento descrito para la generación de ratones CD40hu/FcγR.

EJEMPLO 2

Respuesta de células T específica de OVA

Los ratones fueron inmunizados mediante inyección *i.p.* de 2 μg de DEC-OVA (mIgG1-D265A) (producida tal como se ha descrito anteriormente por (Li y Ravetch (2011) Science 333, 1030-1034) en presencia o ausencia de 10 μg de IgG anti-CD40 (excepto las IgG ChiLob, que se usaron a 40 μg/ratón) con uno de los diversos Fc. Siete días después se

recolectó sangre periférica y se tiñó con anti-CD4 conjugado con FITC, anti-CD8 α conjugado con APC y péptido OVA-tetrámero SIINFEKL H-2^b conjugado con PE (TET-OVA, Beckman Coulter) y se analizó en BD LSRFortessa.

EJEMPLO 3

Citometría de flujo

Las poblaciones celulares se definieron con los siguientes marcadores; CD (humanas: HLA-DR⁺BDCA1⁺CD209⁺CD3⁻CD14⁻CD19⁻CD59⁻; de ratón: CD11b⁺CD11c⁺MHC II⁺F4/80⁻), monocitos (humanos: CD14⁺HLA-DR⁺CD15⁻; de ratón: CD11b⁺Ly6C⁺F4/80⁻CD11c⁻), macrófagos (humanos: CD14⁺CD68⁺; de ratón: CD11b⁺F4/80⁺Ly6C⁻Ly6G⁻), células B (humanas: CD19⁺; de ratón: B220⁺), células T (humanas: CD3⁺CD56⁻; de ratón: CD3), células NK (humanas: CD16⁺CD56⁺CD3⁻; de ratón: NK1.1), neutrófilos (humanos: CD15⁺CD16⁺CD49d⁻; de ratón: CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{int}F4/80).

EJEMPLO 4

Inmunización contra el virus H1N1

Los ratones se inmunizaron con influenza H1N1 recombinante (Sino Biological Inc.) en presencia de alúmina como adyuvante. Después de 11 días se recolectó sangre y se analizó para detectar IgG específica anti-influenza H1N1 utilizando el protocolo de ELISA estándar.

EJEMPLO 5

SPR

Todos los experimentos se llevaron a cabo con un sistema de resonancia del plasmón superficial (SPR) Biacore T100 (Biacore, GE Healthcare), tal como se ha descrito anteriormente (Bournazos, et al., 2014, Cell 158, 1243-1253). En resumen, se llevaron a cabo experimentos a 25 °C en tampón HBS-EP+ (HEPES 10 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM; EDTA 3,4 mM; tensioactivo P20 al 0,005 % (v/v)). Para la medición de la afinidad de las variantes de subclase de IgG para Fc γ R e IgG de CD40 recombinantes se inmovilizaron en chips CM5 Serie S por acoplamiento de aminas y se inyectaron ectodominios solubles de muestras de Fc γ R o CD40 a través de celdas de flujo a diferentes concentraciones. Para algunos Fc γ R, las mediciones se repitieron en una orientación inversa mientras inmovilizando el Fc γ R e inyectando IgG solubles. Se restó la unión de fondo a las celdas de flujo inmovilizadas de blanco y se calcularon las constantes de afinidad utilizando el software de evaluación Biacore T100 (GE Healthcare) mediante el modelo de unión de Langmuir 1:1.

EJEMPLO 6

Ensayo de competición basado en SPR

Los experimentos de competición de SPR se llevaron a cabo en un instrumento Biacore T100 utilizando un tampón de fosfato sódico 10 mM, cloruro sódico 130 mM, Tween-20 al 0,05 %, pH 7,1 a 25 °C, en una superficie que consistía en CD40hu-Fc inmovilizado en un chip sensor CM5 utilizando química estándar de acoplamiento de aminas. La competición para la unión a CD40huL-Fc se evaluó utilizando la función de "inyección dual" en el software de control T100, mediante la inyección de la molécula 1 (anticuerpo parental o CD40L), seguida inmediatamente por la misma concentración de la molécula 1, o una mezcla de molécula 1 y molécula 2. Las respuestas de unión se compararon con una inyección de control de la molécula 2 por sí sola. Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando 180 s de tiempo asociación y disociación a 30 μ l/min. La superficie se regeneró con éxito entre ciclos utilizando dos pulsos de 15 s de glicina 10 mM, pH 1,5 a un caudal de 30 μ l/min.

EJEMPLO 7

ELISA de unión a CD40

La especificidad y afinidad de unión de las subclases de IgG se determinaron mediante ELISA utilizando CD40 recombinante (Sino Biological Inc.). Se recubrieron placas de ELISA (Nunc) durante la noche a 4 °C con dominio extracelular recombinante de CD40 humano (1 μ g/pocillo). Todas las etapas secuenciales se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Después del lavado, se bloquearon las placas durante 1 h con PBS/leche desnatada al 2 % y seguidamente se incubaron durante 1 h con IgG diluidas en serie (diluciones 1:3 consecutivas en PBS/leche desnatada al 2 %). Después del lavado, se incubaron las placas durante 1 h con anticuerpo anti-IgG humana conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch). La detección se realizó utilizando un kit de sustrato de peroxidasa de dos componentes (KPL) y las reacciones se detuvieron con la adición de ácido fosfórico 1 M. Se registró inmediatamente la absorbancia a 405 nm utilizando un espectrofotómetro SpectraMax Plus (Molecular Devices) y se restó la absorbancia de fondo de las muestras de control negativo.

EJEMPLO 8

Generación y producción de Fc variantes anti-CD40

Se sintetizaron las regiones pesadas y ligeras variables del clon 21.4.1 de anticuerpo anti-CD40 humano (patente US n.º 7.338.660) (Genwize) y se clonaron en vectores de expresión de mamífero con esqueletos de IgG1 humana, IgG2 humana o Fc kappa humana, tal como se ha descrito anteriormente (Li y Ravetch (2011) Science 333, 1030-1034). Para la generación de variantes de dominio Fc de IgG1 humano (N297A, S267E, S267E/L328F, G237D/P238D/P271G/A330R, G237D/P238D/H268D/P271G/A330R) e IgG2 humano (C127S, C232S), se realizó mutagénesis dirigida al sitio utilizando cebadores específicos basados en el kit II de mutagénesis dirigida a sitio QuikChange (Agilent Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secuencias de plásmidos mutados se validaron mediante secuenciación directa (Genewiz).

Los anticuerpos se generaron mediante transfección transitoria de células HEK293T (ATCC), purificadas con proteína G-sefarosa 4 Fast Flow (GE Healthcare), se dializaron en PBS y se esterilizaron mediante filtración (0,22 µm), tal como se ha descrito anteriormente (Nimmerjahn, et al. (2005) Immunity 23, 41-51). Se evaluó la pureza mediante SDS-PAGE y tinción de Coomassie, y se estimó en >90 %. Los anticuerpos utilizados para los experimentos *in vivo* se cuantificaron para la contaminación por endotoxinas (LPS) mediante el ensayo de lisado de amebocitos de Limulus (LAL, por sus siglas en inglés) y se verificó que presentaban niveles <0,1 EU/µg. La IgG policlonal humana se adquirió de Bio X Cell.

EJEMPLO 9

Reto tumoral y tratamiento

Se implantaron células MC38 (2×10^6) por vía subcutánea y se midieron los volúmenes tumorales cada 2-3 días con un calibrador electrónico y se informaron como volumen utilizando la fórmula $(L_1^2 \times L_2)/2$, mientras que L_1 era el diámetro más corto y L_2 era el diámetro más largo. Siete días después de la inoculación tumoral, se aleatorizaron los ratones por tamaño tumoral (día 0) y recibieron una inyección intraperitoneal (i.p) de 200 µg de IgG anti-CD40 o de control. Los ratones recibieron 200 µg adicionales de tratamiento con IgG el día 3. Para el modelo de metástasis pulmonar B16, los ratones recibieron una inyección intravenosa de 1×10^6 células B16-F10 y se trataron con 40 µg de los anticuerpos los días 1 y 4 después de la inyección de células tumorales. El día 14 se recolectaron los pulmones y se analizaron para detectar la presencia de focos de metástasis superficial utilizando un microscopio de disección.

EJEMPLO 10

Generación de candidatos clínicos de Fc variantes anti-CD40

Para analizar si la actividad *in vivo* de las IgG humanas con diana en CD40 humano requería la interacción con FcγRIIBhu y determinar si tales interacciones podían diseñarse adicionalmente para optimizar la actividad del anticuerpo parental, se clonaron las regiones variables del clon anti-CD40 2141 (CP-870,893, originalmente un isotipo de IgG2) en anticuerpos de Fc modificada con capacidad diferencial para acoplarse a los FcγR humanos. Entre ellos se incluían IgG1 humana de tipo salvaje y una serie de IgG1 mutadas con afinidades de unión crecientes a FcγRIIBhu. La FIG 1D de ELISA, y la SPR (Tabla 3) confirmaron que los diferentes dominios Fc introducidos en anticuerpos 2141 no alteraron ni su especificidad de unión ni su afinidad para el CD40 humano. La Tabla 4 resume las afinidades de diferentes Fc variantes del clon 2141 para FcγRIhu recombinante, FcγRIIAhu, FcγRIIBhu y FcγRIIIAhu, evaluadas mediante SPR.

Tabla 3

Afinidades de Fc variantes 21.4.1 para CD40 humano

Fc variante	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
IgG1	5.973×10^4	1.189×10^{-3}	1.991×10^{-9}
IgG1-N297A	5.234×10^4	1.161×10^{-3}	2.219×10^{-9}
IgG1-S267E	4.999×10^4	1.155×10^{-3}	2.309×10^{-9}
IgG1-S267E/L328F	4.232×10^4	1.159×10^{-3}	2.738×10^{-9}
IgG1- G237D/P238D/P271G/A330R (V9)	4.117×10^4	1.129×10^{-3}	2.878×10^{-9}
IgG1- G237D/P238D/H268D/P271G/A330R (V11)	4.1×10^4	1.125×10^{-3}	2.743×10^{-9}
IgG2	3.485×10^4	1.081×10^{-3}	3.101×10^{-9}
IgG2- C232S (IgG2A)	3.515×10^4	1.088×10^{-3}	3.095×10^{-9}
IgG2- C127S (IgG2B)	3.549×10^4	1.096×10^{-3}	3.088×10^{-9}

Se obtuvieron las constantes de unión mediante análisis de SPR con IgG inmovilizadas y CD40 soluble

Tabla 4

Afinidades de Fc variantes 21.4.1 para FcγR humanos

Fc variante	Inhibidores				Activadores			
	FcγRIIbhu		FcγRIhu		FcγRIIAhu ^{H131}		FcγRIIAhu ^{F168}	
	K _D (M)	Factor	K _D (M)	Factor	K _D (M)	Factor	K _D (M)	Factor
IgG1 tipo salvaje	3.01 X 10 ⁻⁶	1	5.17 X 10 ⁻⁷	1	1.16 X 10 ⁻⁶	1	6.7 X 10 ⁻⁶	1
N297A	n.d.b.	NA	n.d.b.	NA	n.d.b.	NA	n.d.b.	NA
SE	8.33 X 10 ⁻⁶	30.2	2.6 X 10 ⁻⁶	1.1	9.8 X 10 ⁻⁶	15.9	n.d.b.	NA
SELF	4.31 X 10 ⁻⁶	69.8	3.68 X 10 ⁻⁶	1.4	1.77 X 10 ⁻⁶	65.5	n.d.b.	NA
V9	9.39 X 10 ⁻⁶	32	5.78 X 10 ⁻⁷	0.009	4.11 X 10 ⁻⁶	0.28	n.d.b.	NA
V11	3.15 X 10 ⁻⁶	95.6	2.3 X 10 ⁻⁷	0.022	3.84 X 10 ⁻⁶	0.3	n.d.b.	NA
IgG2	<10 ⁻⁶	NA	n.d.b.	NA	<10 ⁻⁶	NA	<10 ⁻⁶	NA

Las constantes de unión se obtuvieron mediante análisis de SPR.

Factor = K_D(IgG1)/K_D(Fc variante)

n.d.b.: unión indetectable; NA: no aplicable

Valores de K_D y factores de cambio respecto a IgG1 de tipo salvaje para el mutante SE son de referencias (Smith et al. y Chu et al., 2008).

EJEMPLO 11

Se requiere el acoplamiento de FcγR para la actividad in vivo de los mAb anti-CD40 humanos

Mientras que el isotipo IgG1 presenta interacciones de afinidad relativamente altas con todos los FcγR humanos, el isotipo IgG2 de CP-870.893 presenta afinidades de unión muy bajas para los FcγR humanos, con la excepción de FcγRIIA^{H131} (FIG. 3A y Tabla 4). La eficacia de los isotipos IgG1 e IgG2 de anti-CD40 *in vivo* en el contexto de los FcγR humanos se comparó mediante el ensayo de su capacidad de activar y expandir las células T en el modelo CD40/FcγR humanizado. Se administró ovalbúmina (OVA) en células dendríticas mediante el anticuerpo anti-DEC205 quimérico conjugado con OVA ("DEC-OVA" ("Li y Ravetch (2011) Science 333, 1030-1034)) junto con las subclases de IgG1-Fc, IgG2-Fc o Fc-nulo N297A humanas del mAb anti-CD40 CP-870.893, y se realizó un seguimiento para la presencia de células T específicas de OVA en la circulación después de 7 días (FIG. 3B). Mientras que los isotipos IgG1 y IgG2 presentaron efectos adyuvantes en la activación de las células T, IgG1 resultó en una respuesta de las células T significativamente mayor en comparación con el isotipo IgG2 del mismo clon anti-CD40. La actividad de IgG1 fue completamente revertida mediante la introducción de la mutación N297A, que impide la unión a los FcγR, lo que implica que el acoplamiento de FcγR es necesario para la actividad agonista de la IgG1 anti-CD40. La actividad significativa de IgG2 se perdió al someterla a ensayo en forma desglucosilada que presenta una afinidad de unión reducida a FcγRIIb en comparación con la IgG2 de tipo salvaje. Lo anterior implica también en la actividad dependiente de FcγR de la IgG2 anti-CD40 y sugiere que la actividad relativamente reducida de IgG2 en comparación con el isotipo IgG1 podría explicarse por sus bajas afinidades de unión a los FcγR humanos. En contraste con esa conclusión, se ha planteado que la actividad agonista del anticuerpo anti-CD40 de la subclase IgG2 es independiente de FcγR y el resultado de la configuración única de la bisagra de IgG2 (White, et al. (2015) Cancer Cell 27, 138-148), mediada por enlaces de disulfuro reorganizados entre la bisagra de IgG2 y las regiones CH1. Para someter a ensayo dicha posibilidad, se mutaron cisteínas específicas de CP-870.893, lo que resultó en formas conformacionales bloqueadas: la conformación de Y clásica "IgG2-A" y la conformación más compacta "IgG2-B" obtenida mediante las mutaciones C232S y C127S, respectivamente (Allen et al., 2009, Biochemistry 48, 3755-3766). Ambas formas de IgG2 resultaron en actividad similar a IgG2 de tipo salvaje, lo que implica que la conformación de la región de bisagra no dicta la actividad agonista *in vivo* del isotipo IgG2 de este clon de anticuerpos en el contexto de los FcγR humanos. Además, se comparó la actividad agonista *in vivo* de las formas IgG2-A e IgG2-B de CP-870.893 en ratones transgénicos para CD40 humano en un fondo FcγR de ratón o humano y se encontró que en el fondo FcγR de ratón solo la forma IgG2-B estaba activa, mientras que en el fondo FcγR humano, ambas formas presentaban una actividad significativa y similar. Los datos obtenidos para los anticuerpos CP-870.893 resultan adicionalmente corroborados por la jerarquía similar de la actividad agonista observada para la IgG1 y las formas 2A y 2B de la subclase IgG2 de ChiLob 7/4, otro clon de anticuerpos agonistas de CD40 humano que reconoce un epítipo distinto de 2141. Mientras que se informó que la subclase IgG2 de ChiLob 7/4 presentaba una potencia superior en comparación con su forma IgG1 en ausencia o presencia de FcγR de ratón, los presentes inventores también observaron que para este clon, en presencia de FcγR humanos, la subclase IgG1 era superior a IgG2, y que ambas formas conformacionales de IgG2 presentaban una

actividad similar. Tal como se observa para CP-870.893, al someterlo a ensayo en ratones CD40hu/mFcγR, solo la forma IgG2-B era activa y resultaba en una actividad significativamente incrementada en comparación con IgG2-A.

Estos datos indican que, en el contexto fisiológico de los FcγR humanos, las IgG anti-CD40 humanas agonistas dependen del acoplamiento de FcγR, pero no de la conformación de bisagra para su actividad *in vivo*. Es importante destacar que los datos resaltan la ventaja de utilizar el modelo de ratón FcγR humanizado para estudiar adecuadamente la actividad de las IgG humanas. Al considerar la interacción de la IgG humana con los FcγR humanos, estos ratones evitan los resultados confusos que se pueden generar mediante la utilización de IgG humanas en modelos portadores de FcγR de ratón.

EJEMPLO 12

Actividad optimizada de las IgG anti-CD40 humanas conseguida por Fc variantes potenciadas para la unión de FcγRIIB pero no de FcγRIIA

A continuación, los presentes inventores determinaron si el aumento de las interacciones de unión entre los anticuerpos anti-CD40 humanos y FcγRIIBhu dará lugar a una mayor eficacia *in vivo*. La afinidad de unión y selectividad de las IgG humanas a FcγRIIBhu puede incrementarse mediante la mutagénesis de su dominio Fc. Las Fc variantes de CP-870.893 que portan las mutaciones puntuales S267E (SE) y S267E/L328F (SELF) (Chu et al. (2008) Molecular Immunology 45, 3926-3933) resultan en una afinidad de unión a FcγRIIBhu 30 y 70 veces mayor, respectivamente (FIG. 4A y Tabla 4). Al administrarlas a ratones FcγR/CD40 humanizados, dichas Fc variantes dieron lugar a incrementos pequeños aunque significativos de su capacidad para activar las células T *in vivo* en comparación con la IgG1 de tipo salvaje y las variantes de IgG2 de CP-870.893 (FIG. 4B).

Debido a la similitud de secuencia y estructura entre FcγRIIAhu y FcγRIIBhu, las mutaciones SE y SELF también resultan en una afinidad de unión incrementada a FcγRIIAhu activadora. Por lo tanto, a pesar de un aumento en su afinidad de unión para FcγRIIBhu inhibidor, la relación de afinidad de unión FcγRIIA/FcγRIIB de estas IgG mutadas es similar a la de IgG1 de tipo salvaje y, por lo tanto, se predijo que resultaría en un aumento limitado de la actividad de esta subclase tal como se observó (FIG. 4B). Para optimizar el acoplamiento de Fc de FcγRIIB en ausencia de FcγRIIA, los presentes inventores generaron Fc variantes de CP-870.893 con las mutaciones descritas recientemente, G237D/P238D/P271G/A330R (V9) y G237D/P238D/H268D/P271G/A330R (V11), las cuales potencian la afinidad de unión específicamente a FcγRIIBhu, aunque no a FcγRIIAhu (Mimoto et al., (2013) PEDS 26, 589-598). Las Fc variantes V9- CP-870.893 y V11- CP-870.893 resultan en un aumento de la afinidad de unión a FcγRIIBhu de 32 y 97 veces y una disminución de la afinidad de unión a FcγRIIAhu^{R131} de aproximadamente 3 veces (FIG. 4A y Tabla 4). Ambas Fc variantes, V9 y V11, han mejorado significativamente la actividad *in vivo* en comparación con la subclase IgG2 de CP-870.893 (IgG2), y las variantes SE y SELF de Fc potenciadas tanto para FcγRIIBhu como para FcγRIIAhu. La variante 2141-V11 da como resultado un aumento de 25 veces en la activación de las células T en comparación con CP-870.893-IgG2, y un aumento de 5 veces en comparación con la actividad obtenida por la variante SELF (FIG. 4B). Se observó una jerarquía similar para las Fc variantes de CP-870.893 al determinar el cambio en el peso corporal después de la administración de anticuerpos (FIG. 5A). Mientras que todas las Fc variantes sometidas a ensayo resultaron en disminuciones estadísticamente significativas del peso corporal después de una sola inyección de anti-CD40, el grupo en el que se inyectó V11- CP-870.893 presentó la reducción más significativa.

Los presentes inventores analizaron las propiedades farmacocinéticas (FC) de estas Fc variantes para someter a ensayo si su unión diferencial a FcγR conducía a tasas de aclaramiento FC diferenciales que pudiesen explicar sus diferentes actividades agonistas. Se encontró que las Fc variantes SELF y V11 de CP-870.893 presentaban una tasa de aclaramiento más elevada que la subclase IgG2 (figura 4B), presumiblemente como resultado de su actividad de unión a FcRIIB potenciada. Sin embargo, a pesar del hecho de que SELF y V11 presentan tasas de aclaramiento más elevadas, muestran una actividad agonista superior a la de IgG2. De manera similar, a pesar de las propiedades FC similares de SELF y V11, V11 es el agonista superior en comparación con SELF. Por lo tanto, se excluye la posibilidad de que las diferentes propiedades FC de estas Fc variantes expliquen su actividad agonista.

La influencia del acoplamiento de FcγRIIAhu sobre la actividad de CP-870.893 se evaluó mediante la comparación de su actividad en ratones transgénicos para CD40 y FcγRIIB humanos, pero no para FcγRIIA o ratones transgénicos para CD40, FcγRIIB y FcγRIIA humanos (FIG. 4C). La potencia de activación de células T de CP-870.893-IgG2 se incrementa significativamente en ausencia de FcγRIIA, lo que indica el papel negativo del acoplamiento de FcγRIIA sobre la actividad agonista de este mAb anti-CD40.

La invención demuestra que la manipulación de CP-890.873 para un mayor acoplamiento de FcγRIIBhu a la vez que se mantiene una baja relación de unión FcγRIIA/FcγRIIB da como resultado una actividad agonista optimizada *in vivo* de las IgG anti-CD40 humanas.

Se ha demostrado un aumento de la actividad inmunoestimuladora por el incremento selectivo de la unión de FcγRIIB para el mAb 2141 (CP-870.893) que no bloquea la unión de CD40hu a CD40L, demostrando que los mAb anti-CD40 humanos agonistas se pueden optimizar mediante la potenciación selectiva de la unión de FcγRIIB mediante la

manipulación de Fc independientemente de sus epítomos de unión y su capacidad de bloqueo cruzado de la unión de CD40L a CD40.

La importancia de las interacciones de FcγR para el mAb de CD40 humano más potente se ha demostrado clínicamente, entre otros contextos, y la manipulación selectiva de las interacciones de FcγR mediante la manipulación de Fc incrementa la potencia de estos fármacos. Estas conclusiones fueron posibles mediante el uso de un modelo representativo *in vivo* que recapitula fielmente la diversidad y especificidad de tipos celulares del sistema FcγR humano.

La presente invención también refuta la noción de que la especificidad del mAb de CD40 agonista determina sus requisitos de FcγR (independiente de FcγR frente a dependiente de FcγR, respectivamente) para la actividad. CP-870,893, ChiLob 7/4 no compete con la unión de CD40L, pero ha demostrado ser dependiente de FcγR para su actividad óptima *in vivo*.

Se pueden observar diferentes modos de acción entre diferentes clones de mAb, aunque comparten la misma molécula diana. Por ejemplo, recientemente se ha observado que los mAb de PD-1 antagonistas presentan el potencial de proporcionar agonismo dependiente de FcγRIIB basándose en su especificidad de epítipo (Dahan et al. (2015) Cancer Cell 28, 285-295). Aunque los modelos de ratón pueden ser muy informativos para evaluar la actividad de los mAb, traducir la actividad de los mAb en el ratón al uso terapéutico humano no es sencillo y los mecanismos terapéuticos observados para un mAb de ratón podrían resultar alterados durante el desarrollo de las IgG humanas homólogas. Al humanizar tanto CD40 como los FcγR, se generó un modelo de ratón que permitía la evaluación *in vivo* de productos clínicos mediante la consideración de la actividad mediada por sus dominios Fab y Fc. Estos ratones permiten la selección de "cabezas de serie" de un panel de mAb de CD40 humano basándose en su potencia agonista *in vivo*. Se debe utilizar un enfoque similar para la generación de ratones humanizados para otras dianas terapéuticas en el fondo de FcγRhu para la selección óptima de mAb inmunomoduladores adicionales.

Aunque la actividad agonista incrementada está mediada por Fc variantes de unión incrementada para tanto FcγRIIA como FcγRIIB (p. ej., por mutaciones de Fc S267E o S267E/L328F), su potencia está limitada por su unión incrementada a FcγRIIA activador. Por lo tanto, los Fc variantes con potenciación selectiva de la unión únicamente a FcγRIIB inhibidor se ha indicado en el presente estudio que son los derivados más potentes de mAb de CD40. La falta de actividad de los mAb de CD40 de ratón portadores de la subclase IgG2a que se une preferentemente a los FcγR activadores está asociada al agotamiento de las células que expresan CD40 (Li y Ravetch (2011) Science 333, 1030-1034). Dado que el FcγRIIA humano, pero no el FcγRIIA, actúa como mediador *in vivo* en el agotamiento por los mAb (DiLillo y Ravetch (2015) Cell 161, 1035-1045), y los mutantes S267E o S267E/L328F están mejorados para FcγRIIA pero no para FcγRIIA, la potencia reducida del mAb CD40 mediada por el acoplamiento de FcγRIIA no se produce a través del agotamiento de las células que expresan CD40. El mecanismo que explica este efecto inhibitorio de FcγRIIA es el objeto de las actuales investigaciones de los presentes inventores. El polimorfismo de histidina (H)/arginina (R) en la posición 131 de FcγRIIA dicta su afinidad de unión a IgG2, FcγRIIA^{H131} presenta aproximadamente 5 veces mayor afinidad para IgG2 que FcγRIIA^{R131} (van Sorge et al. (2003) Tissue Antigens 61, 189-202). Debido al efecto inhibitorio de FcγRIIA sobre la actividad de CP-870,893, los pacientes portadores del genotipo FcγRIIA^{131H/H} pueden presentar una respuesta reducida al tratamiento con CP-870,893. Los ratones humanizados portan el genotipo FcγRIIA^{131R/R}, pero se está generando una cepa FcγRIIA^{131H/H} para que pueda dilucidarse la contribución del polimorfismo alélico de FcγRIIA en la actividad de los mAb anti-CD40.

EJEMPLO 13

La Fc variante V11 del anticuerpo anti-CD40 presenta una actividad antitumoral superior

Se evaluó si el aumento de la actividad agonista observado para las Fc variantes mutadas mejoradas por FcγRIIB podía traducirse en un aumento de la actividad antitumoral de los mAb anti-CD40. Los ratones CD40/FcγR humanizados fueron inoculados con los tumores singénicos de adenocarcinoma de colon MC38 y tratados con las Fc variantes 2141 IgG2, SELF y V11 del mAb anti-CD40 agonista 2141. Los tratamientos con IgG2 (CP-870,893) y las Fc variantes SELF resultaron en efectos antitumorales similares (reducción de aproximadamente 65 % del volumen tumoral en comparación con el control sin tratamiento, y 20 % a 33 % de ratones libres de tumor, respectivamente). Sin embargo, el tratamiento con la Fc variante V11 dio como resultado una respuesta antitumoral drásticamente mejorada y una recuperación completa frente a los tumores en todos los ratones de ese grupo. Se observó una tendencia similar utilizando el modelo de melanoma metastásico B16, en el que se observó una reducción estadísticamente significativa del número de metástasis pulmonares solo en ratones tratados con V11 pero no con Fc variantes SELF o IgG2. Estos datos indican que la actividad antitumoral de CP-870,893 podría mejorarse mediante manipulación de Fc del anticuerpo para proporcionar un aumento selectivo del acoplamiento de FcγRIIB y destacan la Fc variante V11 de este clon de mAb como el candidato clínico óptimo.

La conformación única de la bisagra del isotipo IgG2 humano se ha informado recientemente que mejora la actividad agonista de los mAb CD40 de una manera independiente de FcγR. Por lo tanto, se sugirió que la actividad agonista superior observada para CP-870,893 se debía a su isotipo IgG2 comparado con el isotipo IgG1 del otro anticuerpo de CD40 agonista en las evaluaciones clínicas, ChiLob 7/4 y SGN40. Al generar ChiLob 7/4 y SGN40 como IgG2,

resultaron en una potencia incrementada respecto a su isotipo IgG1 original (White et al. (2015) Cancer Cell 27, 138-148). Una desventaja de dicho estudio es que los mAb fueron evaluados solo en la presencia (o ausencia) de FcγR de ratón y que no se evaluó su potencia dependiente del isotipo en el contexto correcto de los FcγR humanos. En la presente memoria se demuestra que el uso de ChiLob 7/4 como IgG2 resulta en una actividad reducida en comparación con IgG1 en el contexto de los FcγR humanos. Además, los presentes inventores evaluaron la actividad de las subclases IgG1 vs IgG2, incluyendo las formas 2A y 2B de IgG2, tanto de CP-870.893 como de ChiLob 7/4 y encontraron que IgG1 era más potente que IgG2 y que su actividad era dependiente de FcγR. Por lo tanto, concluyeron que la actividad agonista superior de la IgG2 anti-CD40 humana observada en ratones no es relevante a su actividad clínica en seres humanos. Además, la potencia relativamente alta de CP-870.893 en comparación con otros mAb de CD40 no es un resultado del isotipo IgG2 y es probablemente el resultado del reconocimiento por los mAb de un epítipo agonista específico único. Finalmente, la mejora selectiva de la unión de FcγRIIb es, con mucho, la estrategia más eficiente para mejorar la potencia del agonismo de los mAb de CD40.

TABLA 2

Resumen del listado de secuencias	
SEC ID	Descripción
1	CD40 humano (2141) cadena pesada
2	Cadena ligera de CD40 humano ¹
3	Cadena pesada N297A
4	Cadena pesada SE
5	Cadena pesada SELF
6	Cadena pesada V9
7	Cadena pesada V11
8	IgG2 2141 - Cadena pesada
9	IgG2 2141 C127S - Cadena pesada
10	IgG2 2141 C232S - Cadena pesada
11	CD40 humano (NP_001241.1)
12	CD40L humano (NP_000065.1)
13	Secuencia de señal

¹ Las secuencias de cadena ligera para todas las Fc variantes de 2141 (CP-870.893) son idénticas a la secuencia SEC ID n.º 2.

SEC ID n.º 1 - 2141-IgG1 Cadena pesada

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVR
 QAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFPQGRVTMTRDTSIS
 TAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYW
 GQGTLVTVSSATTKGPSVFPLAPSSKSTISGGTAALGCLVK
 DYFPEPPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
 VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
 VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
 VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID n.º 2 - 2141 - IgG1 Cadena ligera

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGIYSWLAWYQQKP
GKAPNLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFILTISSLQPED
FATYYCQQANIFPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC

SEC ID n.º 3 – 2141 - IgG1 N297A Cadena pesada

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVR
QAPGGGLEWMGWINPDSSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSIS
TAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYW
GQGTLVTVSSATTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID n.º 4 – 2141 - IgG1 S267E Cadena pesada

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVR
QAPGGGLEWMGWINPDSSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSIS
TAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYW
GQGTLVTVSSATTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID n.º 5 – 2141 - IgG1 S267E/L328F Cadena pesada

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVR
 QAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFPQGRVTMTRDTSIS
 TAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYW
 GQGTLVTVSSATTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
 VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
 VLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQ
 VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID n.º 6 – 2141 - IgG1- G237D/P238D/P271G/A330R (V9) - Cadena pesada

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVR
 QAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFPQGRVTMTRDTSIS
 TAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYW
 GQGTLVTVSSATTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
 VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPELLG**DD**SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
 EDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
 VLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**PR**PIEKTISKAKGQPREPQ
 VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID n.º 7 – 2141 - IgG1- G237D/P238D/H268D/P271G/A330R (V11) - Cadena pesada

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVR
 QAPGQGLEWMGWINPDSSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSIS
 TAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYW
 GQGTLVTVSSATTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
 VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPELLG**DD**SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSD
 EDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
 VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP**R**PIEKTISKAKGQPREPQ
 VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID n.º 8 – 2141 - IgG2 Cadena pesada

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVR
 QAPGQGLEWMGWINPDSSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSIS
 TAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYW
 GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
 YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
 PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPA
 PPVAGPSVFLEPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
 QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQD
 WLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLF
 PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID n.º 9 – 2141 - IgG2 C127S Cadena pesada

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVR
 QAPGGGLEWMGWINPDSSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSIS
 TAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYW
 GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKD
 YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
 PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVVERKCCVECPPCPA
 PPVAGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
 QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQD
 WLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLP
 PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHREAL
 HNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID n.º 10 – 2141 - IgG2 C232S Cadena pesada

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVR
 QAPGGGLEWMGWINPDSSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSIS
 TAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYW
 GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
 YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
 PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVVERKSCVECPPCPA
 PPVAGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
 QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQD
 WLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLP
 PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHREAL
 HNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID n.º 13 Secuencia de señal

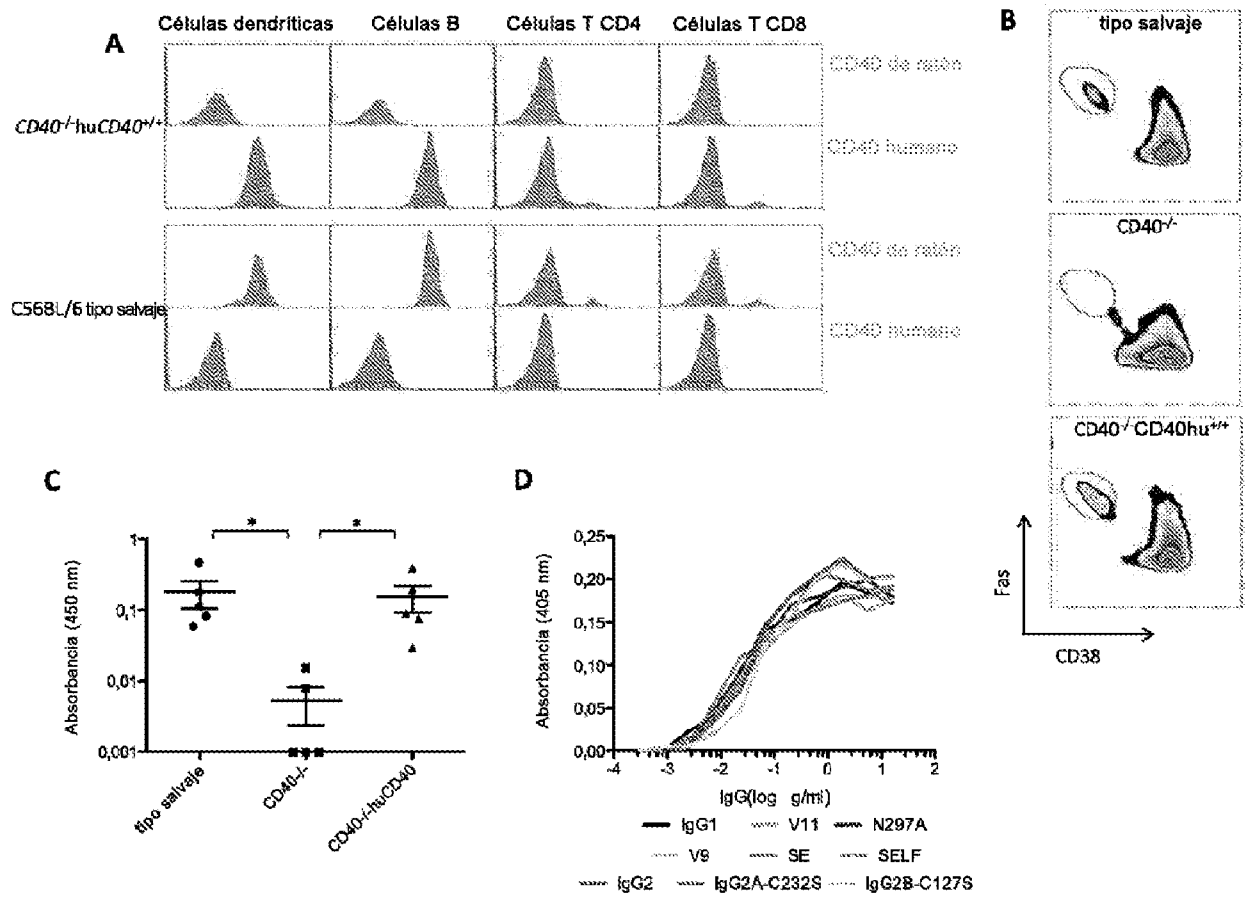
MVRLPLQCVLWGCLLTAVHP

El listado de secuencias proporciona las secuencias de las cadenas maduras pesadas y ligeras (es decir, las secuencias no incluyen péptidos de señal). Una secuencia de señal para la producción de los anticuerpos de la presente invención, por ejemplo en células humanas, se proporciona en SEC ID n.º 13.

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que:
5 (i) se une específicamente a CD40 humano, y
 (ii) comprende una cadena pesada que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 7 y una cadena ligera que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID n.º 2.
2. Ácido nucleico que codifica la región variable pesada y/o ligera del anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1.
3. Vector de expresión que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 2.
4. Célula transformada con un vector de expresión según la reivindicación 3.
5. Método de preparación de un anticuerpo anti-CD40 humano, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende:
20 a) expresar el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, en la célula según la reivindicación 4, y
 b) aislar el anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, a partir de la célula.
6. Composición farmacéutica, que comprende:
25 a) el anticuerpo, o porción de unión a antígeno, según la reivindicación 1, y
 b) un portador.
7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, para el uso en terapia.
- 30 8. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, para la utilización en un método de estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto que la necesita, en donde el sujeto presenta un tumor y se estimula una respuesta inmunitaria contra el tumor.
- 35 9. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, para la utilización en un método de estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto que la necesita, en donde el sujeto presenta una infección vírica crónica y se estimula una respuesta inmunitaria contra la infección vírica.
10. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, para el uso en el tratamiento del cáncer.
- 40 11. Composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 10, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer uterino/cervical, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de esófago, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer renal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pulmonar, cáncer de estómago, cáncer de células germinales, cáncer óseo, cáncer hepático, cáncer tiroideo, cáncer de piel, neoplasia del sistema nervioso central, linfoma, leucemia, mieloma, sarcoma, y cáncer relacionado con un virus.
- 45 12. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, para la utilización en el tratamiento de una infección vírica crónica.

50



FIGS. 1A, 1B, 1C y 1D

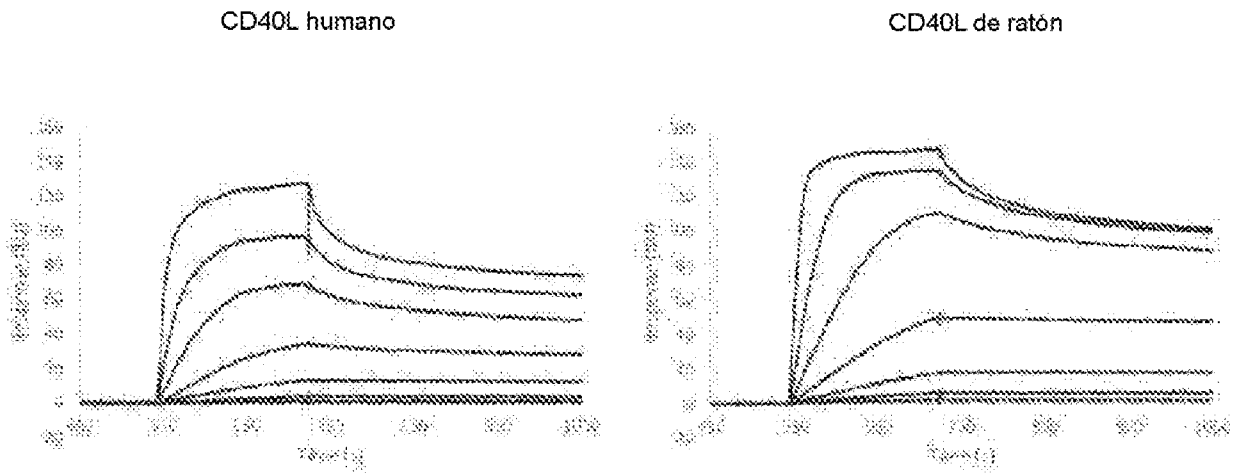
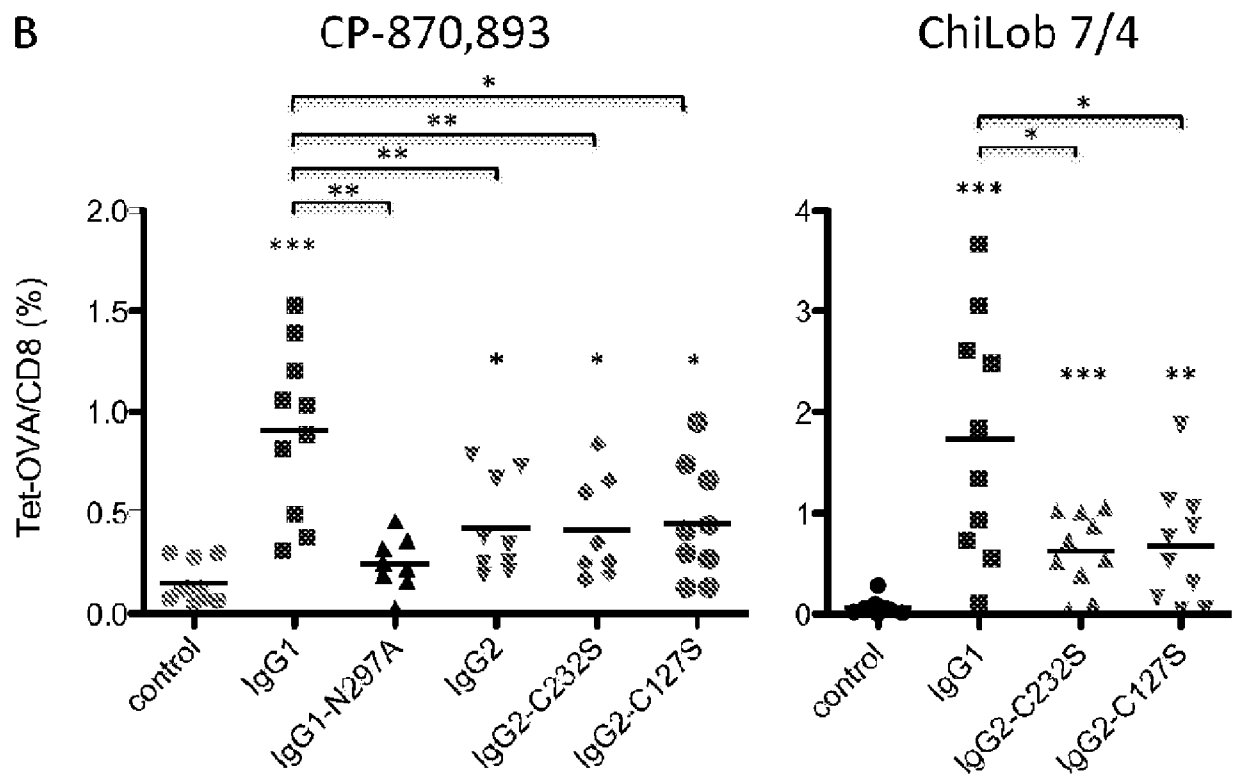


FIG. 2

A

Perfiles de afinidad de unión de los FcγR de las Fc variantes de 2141

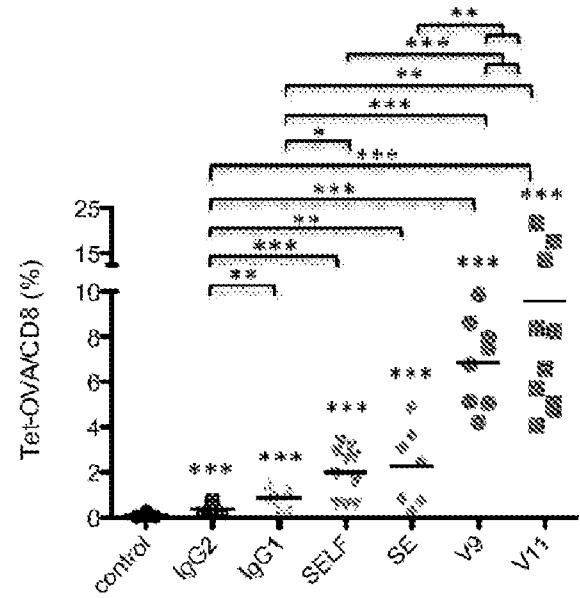
2141-subclase de antic.	Inhibidor	Activador		
	FcγRIIB	FcγRI	FcγRIIA	FcγRIIIA
IgG1	++	+++++	++	++
N297A	-	-	-	-
IgG2 (CP- 870,893)	+	-	+	+

B**FIGS. 3A y 3B**

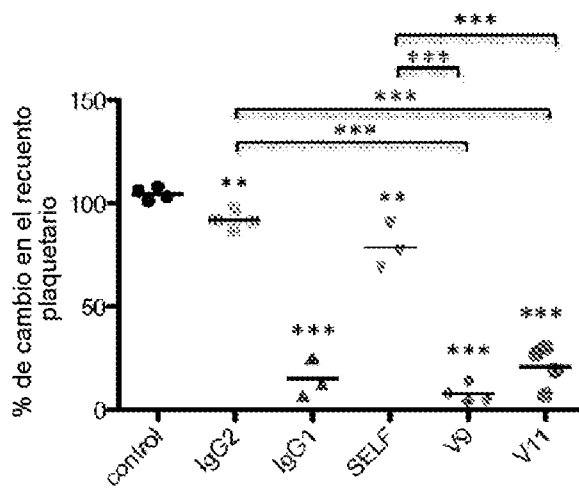
A

Variante	Porcentaje inducida	% de el n.º de B
IgG1	1	2,7
SELF	70	2,4
SE	30	0,9
V9	32	0,02
V11	96	0,01

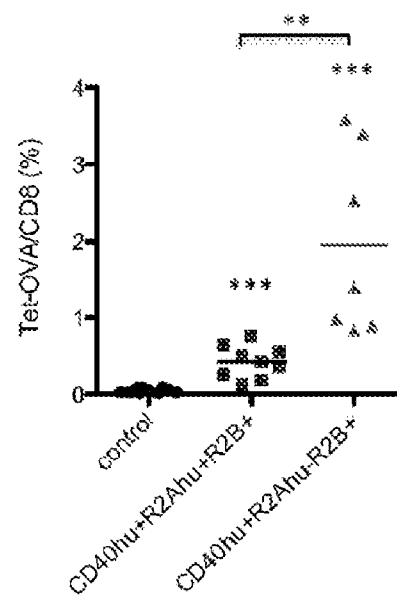
B



C

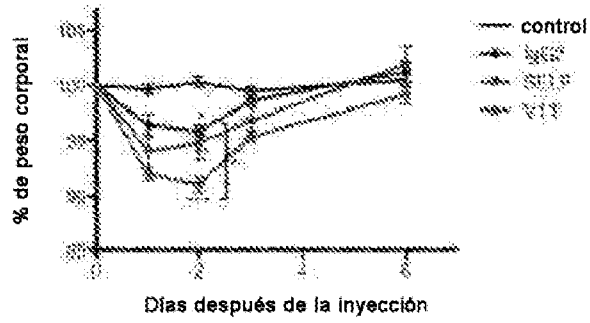


D

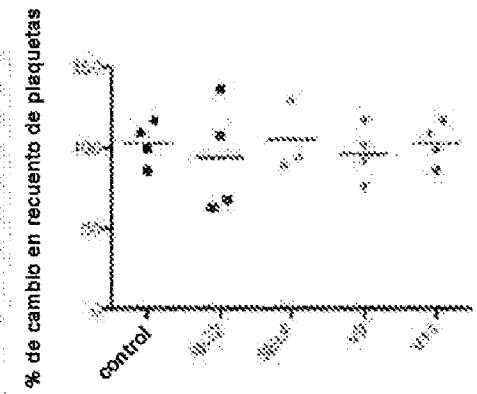


FIGS. 4A, 4B, 4C y 4D

A



B



FIGS. 5A y 5B