



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 346 977**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04810421 .0**
96 Fecha de presentación : **04.11.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1682178**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.07.2006**

54 Título: **Procedimiento de terapia para cánceres que expresan el antígeno CD40.**

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

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.10.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.10.2010

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

72 Inventor/es: **Long, Li;**
Luqman, Mohammad;
Yabannavar, Asha;
Zaror, Isabel;
Hurst, Deborah y
Lopes de Menezes, Daniel, E.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 346 977 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

Procedimiento de terapia para cánceres que expresan el antígeno CD40.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a procedimientos de terapia de combinación para cánceres que comprenden células neoplásicas que expresan el antígeno CD40, incluidos cánceres relacionados con las células B y tumores sólidos.

10 **Antecedentes de la invención**

A más de un millón de americanos se les diagnostica cáncer todos los años. Leucemia, linfomas y mielomas afectan a más de 100.00 individuos solo en EE.UU. Los tumores sólidos, como el cáncer de mama, el cáncer de ovarios y el cáncer de pulmón, afectan a un número incluso mayor de individuos. Para combatir estas enfermedades se ha desarrollado la inmunoterapia. Generalmente, la inmunoterapia refuerza la respuesta antitumoral del paciente contra las células tumorales diana. La terapia con citocinas es un procedimiento de inmunoterapia que activa la inmunovigilancia, especialmente contra tumores y antígenos tumorales. Como alternativa, se puede apuntar directamente a las células cancerosas usando terapia con anticuerpos. Estos anticuerpos son específicos de antígenos de superficie celular individuales que se expresan sobre las células cancerosas y los resultados de los ensayos clínicos son prometedores. Se han obtenido resultados terapéuticos satisfactorios usando anticuerpos dirigidos a antígenos tales como el CD20 (que se expresa sobre células B normales y muchos linfomas de células B) y el HER2 (que se expresa en muchos carcinomas de mama).

Un gran porcentaje de casos de cáncer se caracterizan por un sobrecrecimiento de las células neoplásicas que expresan el antígeno CD40. El antígeno CD40 es un antígeno de superficie celular de 55 kDa presente en la superficie tanto de las células B normales como de las células B neoplásicas humanas, células dendríticas, otras células presentadoras de antígenos (APC), células endoteliales, células monocíticas y células epiteliales. La unión del ligando de CD40 al antígeno CD40 en la membrana de la célula B proporciona una señal coestimuladora que estimula la activación y proliferación de las células B, causando la maduración de la célula B a una célula plasmática que secreta altos niveles de inmunoglobulinas solubles. Las células transformadas de pacientes con linfomas de células B de bajo y alto grado, leucemia linfoblástica aguda de células B, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica y enfermedad de Hodgkin expresan el antígeno CD40. La expresión de CD40 también se detecta en dos tercios de los casos de leucemia mieloblástica aguda y en 50% de los linfomas relacionados con el SIDA. Las células B malignas de diversos tumores de linaje de células B niveles altos de CD40 y parecen depender de la señalización de CD40 para la supervivencia y proliferación.

La expresión de CD40 también se ha detectado en muchos cánceres que no son de células B. Entre los carcinomas que expresan CD40 se incluyen carcinoma de vejiga urinaria (Paulie y col. (1989) J. Immunol. 142:590-595; Braesch-Andersen y col. (1989) J. Immunol. 142:562-567), carcinoma de mama (Hirano y col. (1999) Blood 93:2999-3007; Wingett y col. (1998) Breast Cancer Res. Treat. 50:27-36; cáncer de próstata (Rokhlin y col. (1997) Cancer Res. 57:1758-1768), carcinoma de células renales (Kluth y col. (1997) Cancer Res. 57:891-899), carcinoma nasofaríngeo indiferenciado (LTNPC) (Agathangelou y col. (1995) Am. J. Pathol. 147: 1152-1160), carcinoma de células escamosas (SCC) (Amo y col. (2000) Eur. J. Dermatol. 10:438-442; Posner y col. (1999) Clin. Cancer Res. 5:2261-2270), carcinoma tiroideo papilar (Smith y col. (1999) Thyroid 9:749-755), melanoma cutáneo maligno (van den Oord y col. (1996) Am. J. Pathol. 149: 1953-1961), cáncer de ovarios (Ciaravino y col. (2004) Eur. J. Gynaecol. Oncol. 25:27-32), cáncer de pulmón (Sabel y col. (2000) Cancer Immunol. Immunother. 49:101-8), cáncer cervical (Altenberg y col. (1999) J. Immunol. 162:4140-4147), carcinoma gástrico (Yamaguchi y col. (2003) Int. J. Oncol. 23(6):1697-702), sarcomas (véase, por ejemplo, Lollini y col. (1998) Clin. Cancer Res. 4(8):1843-849, que trata el osteosarcoma humano y el carcinoma de Ewing), y carcinoma hepático (véase, por ejemplo, Sugimoto y col. (1999) Hepatology 30(4):920-26, que trata el carcinoma hepatocelular humano). El papel del CD40 en estos cánceres que no son de células B no se conoce bien. En algunos estudios se ha demostrado que la unión de CD40 en células transformadas puede tener como resultado la muerte celular por apoptosis. No obstante, en algunos cánceres, tales como el melanoma maligno y el cáncer de pulmón, la expresión de CD40 puede ser un indicador pronóstico negativo (véase, por ejemplo, Sabel y col. (2000) Cancer Immunol. Immunother. 49(2):101-108; Ottaiano y col. (2004) Clin. Cancer Res. 10(8): 2824-2831).

La interleucina 2 (L-2) es una citocina que es un potente estimulador de la proliferación y función de células asesinas naturales (NK) y de linfocitos T (véase, por ejemplo, Morgan y col. (1976) Science 193:1007-1011; Weil-Hillman y col. (1989) Cancer Res. 49(13): 3680-3688). La IL-2 tiene actividad antitumoral contra varias neoplasias malignas, bien sola o cuando se combina con células asesinas activadas por linfocinas (LAK) o linfocitos de infiltración tumoral (TIL) (véase, por ejemplo, Rosenberg y col. (1987) N. Engl. J. Med. 316:889-897; Rosenberg (1988) Ann. Surg. 208:121-135; Topalian y col. (1988) J. Clin. Oncol. 6:839-853; Rosenberg y col. (1988) N. Engl. J. Med. 319: 1676-1680; y Weber y col. (1992) J. Clin. Oncol. 10:33-40). Aunque la actividad antitumoral de la IL-2 se ha descrito en pacientes con melanoma metastásico y carcinoma de células renales, otras enfermedades, incluidos los linfomas, también parecen responder al tratamiento con IL-2 (véase, por ejemplo, Dutcher y Wiernik (1993) Sem. Oncol. 20(6 Suppl. 9):33-40). No obstante, dosis elevadas de IL-2 usadas para alcanzar resultados terapéuticos positivos con respecto al crecimiento tumoral con frecuencia causan efectos secundarios graves, incluidos pérdidas capilares, hipotensión y cambios neurológicos (véase, por ejemplo, Duggan y col. (1992) J. Immunotherapy 12:115-122; Gissel-

brecht y col. (1994) Blood 83: 2081-2085; y Sznol y Parkinson 1994) Blood 83:2020-2022). Además, las respuestas clínicas a la IL-2 son variables. Por ejemplo, la mediana del índice de supervivencia para los subgrupos de pacientes con carcinoma de células renales tratados con IL-2 puede ser de entre 28 y 5 meses en función de los factores de riesgo (Palmer y col. (1992) Ann. Oncol. 3:475-80).

Aunque un agente inmunoterapéutico cualquiera puede proporcionar un beneficio al paciente, se necesitan otros procedimientos para reducir la toxicidad, mejorar la eficacia y mejorar los resultados del tratamiento. Además, el cáncer a menudo puede convertirse en resistente al tratamiento con una oncoterapia con un solo agente, bien como resultado de la resistencia iniciar a una terapia con un solo anticuerpo o a una terapia con una sola citoquina, o como resultado de la resistencia que se desarrolla durante uno o más ciclos de tiempo de terapia con el único anticuerpo o la única citocina.

En consecuencia, el descubrimiento de una inmunoterapia de combinación que puede simultáneamente mejorar los resultados del tratamiento con respecto a oncoterapia con un único agente y reducir la toxicidad de una inmunoterapéutica cualquiera puede reducir considerablemente la mortalidad y la morbilidad de los pacientes de cáncer, especialmente de los que sufren tumores sólidos, mielomas, leucemias y linfomas.

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

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

Breve resumen de la invención

La invención proporciona un anticuerpo anti-CD40 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, para usar en un procedimiento de tratar a un sujeto humano por un cáncer que comprende células neoplásicas que expresan el antígeno CD40, en el que dicho procedimiento comprende administrar a dicho sujeto una terapia de combinación, en la que dicha terapia comprende la administración de una cantidad eficaz del anticuerpo anti-CD40, o fragmento de unión a antígeno del mismo, en combinación con una interleucina-2 (IL-2) o una variante biológicamente activa de la misma, estando dicho anticuerpo anti-CD40, o fragmento de unión a antígeno del mismo, exento de actividad agonista cuando se une al antígeno CD40 y se selecciona del grupo constituido por:

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

La invención también proporciona el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo, en combinación con una interleucina-2 (IL-2) o una variante biológicamente activa de la misma en la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto humano por un cáncer que comprende células neoplásicas que expresan el antígeno CD40 mediante terapia de combinación, en la que dicho anticuerpo anti-CD40, o fragmento de unión a antígeno del mismo, está exento de actividad agonista significativa cuando está unido al antígeno CD40 y se selecciona del grupo constituido por:

- a) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 o al anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543;
- b) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de CD40 humano que se muestra en la SEC ID N° 10 o la SEC ID N° 12;
- c) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia de CD40 humano que se muestra en la SEC ID N° 10 o la SEC ID N° 12; y

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

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

Breve resumen de la divulgación

Se divulgan procedimientos de tratar un sujeto por cáncer, que comprende células neoplásicas que expresan el antígeno de superficie celular CD40. Los procedimientos comprenden terapia de combinación con interleucina-2 (IL-2), o una variante biológicamente activa de la misma, y al menos un anticuerpo anti-CD40 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. La administración de estos dos agentes en combinación proporciona mayor eficacia que cualquiera de los dos agentes por separado, lo que resulta en una respuesta terapéutica positiva. En algunas formas de realización se produce un efecto terapéutico sinérgico, lo que convierte a la divulgación en especialmente útil para tratar cánceres que son resistentes a una terapia con un único agente.

De acuerdo con los procedimientos divulgados en la presente memoria descriptiva, a un individuo que lo necesite se le administra una combinación de una IL-2, o una variante biológicamente activa de la misma, y un anticuerpo anti-CD40 antagonista o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Entre las moléculas de interleucina adecuadas se incluyen la IL-2 humana y sus variantes biológicamente activas, tales como la muteína de IL-2 aldesleucina (des-alanil-1, serina-125 interleucina 2 humana). Entre los anticuerpos anti-CD40 antagonistas adecuados para usar en los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva se incluyen anticuerpos monoclonales, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, capaces de unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expresado en la superficie de una célula humana. Estos anticuerpos anti-CD40 antagonistas, están exentos de actividad agonista significativa, pero exhiben actividad antagonista cuando se unen al antígeno CD40 en las células humanas, particularmente cuando se unen al antígeno CD40 sobre células neoplásicas humanas. Anticuerpos monoclonales anti-CD40 adecuados tienen regiones constantes humanas; preferentemente también tienen regiones estructurales total o parcialmente humanizadas; y, más preferentemente son anticuerpos completamente humanos, o fragmentos de unión a antígeno del mismo.

Ejemplos de tales anticuerpos monoclonales anti-CD40 antagonistas son los anticuerpos denominados en el presente documento como CHIR-5.9 y CHIR-12.12, que se pueden producir de forma recombinante; los anticuerpos monoclonales producidos por las líneas celulares de hibridoma denominadas en el presente documento como 131.2F8.5.9 (a la que se hace referencia en el presente documento línea celular 5.9) y 153.8E2.D10.D6.12.12 (a la que se hace referencia en el presente documento línea celular 12.12); un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia mostrada en SEC ID N° 6, la secuencia mostrada en SEC ID N° 7; la secuencia mostrada en SEC ID N° 8, las secuencias mostradas en SEC ID N° 6 y SEC ID N° 7, y las secuencias mostradas en SEC ID N° 6 y SEC ID N° 8; un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia mostrada en SEC ID N° 2, la secuencia mostrada en SEC ID N° 4, la secuencia mostrada en SEC ID N° 5, las secuencias mostradas SEC ID N° 2 y SEC ID N° 4, y las secuencias mostradas SEC ID N° 2 y SEC ID N° 5; un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia mostrada en SEC ID N° 1, la secuencia mostrada en SEC ID N° 3, y las secuencias mostradas en SEC ID N° 1 y SEC ID N° 3; y los fragmentos de estos anticuerpos monoclonales que se unen al antígeno que retienen la capacidad de unirse específicamente al CD40 humano y que están exentos de actividad agonista significativa pero que exhiben actividad antagonista cuando se unen al antígeno CD40 en las células humanas. Ejemplos de tales anticuerpos monoclonales CD40 también incluyen un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 12.12 o al producido por la línea celular de hibridoma 5.9; un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 10 o la SEC ID N° 12; un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 en un ensayo de unión competitiva; y un anticuerpo monoclonal que es un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 o cualquiera de los anteriores anticuerpos monoclonales, en los que el fragmento retiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno CD40 humano.

En algunas formas de realización, estos dos agentes terapéuticos se administran de forma concurrente en forma de dos composiciones farmacéuticas distintas, una que contiene IL-2 o una variante biológicamente activa de la misma, y otra que contiene el anticuerpo anti-CD40 antagonista, el fragmento de unión a antígeno adecuado, en la que cada una se administra de acuerdo con un régimen de dosificación concreto. La composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-CD40 antagonista, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, se administra de acuerdo con un programa de dosificación semanal o, como alternativa, se administra una vez cada dos, tres o cuatro semanas. El anticuerpo anti-CD40 antagonista, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, se puede administrar a lo largo de un periodo de tratamiento o para una duración fija dentro de un periodo de tratamiento. La composición farmacéutica que comprende IL-2, o una variante biológicamente activa de la misma, se administra de acuerdo con un régimen de dosificación constante de IL-2, o se administra de acuerdo con un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles.

El régimen de dosificación constante de IL-2 comprende un periodo de tiempo durante el cual se administra a un sujeto una dosis semanal total constante de IL-2, o de su variante biológicamente activa, seguido por un periodo de tiempo sin dosis de IL-2. Uno o más ciclos de un régimen de dosificación constante de IL-2 se administran a un sujeto que lo necesite. La dosis semanal total que se debe administrar durante cada ciclo del régimen de dosificación constante de IL-2 se puede administrar en forma de una única dosis. Como alternativa, la dosis semanal total administrada durante cada ciclo del régimen de dosificación constante de IL-2 se puede repartir en una serie de dosis equivalentes que se administran de acuerdo con un programa de dosificación de dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete veces a la semana.

El régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles comprende un primer periodo de tiempo de dosificación de IL-2, en el que una dosis semanal total mayor de IL-2, o de su variante biológicamente activa, se administra al sujeto, seguido por un segundo periodo de tiempo de dosificación de IL-2, en el que se administra al sujeto una dosis semanal total menor de IL-2, o de su variante biológicamente activa.

La dosis semanal total de IL-2, o su variante biológicamente activa, durante el segundo periodo de tiempo de la dosificación de IL-2 es menor que la dosis semanal total de IL-2, su variante biológicamente activa, administrada durante el primer periodo de tiempo de dosificación de IL-2. La dosis semanal total que se va a administrar durante el primer periodo de tiempo y/o durante el segundo periodo de tiempo de la dosificación de IL-2 se puede administrar en forma de una dosis única. Como alternativa, la dosis semanal total administrada durante uno o ambos periodos de tiempo, primero y segundo, de la dosificación de la IL-2 se puede repartir en una serie de dosis equivalentes que se administran de acuerdo con un programa de dosificación de dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete veces a la semana. Los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva también proporcionan una interrupción en el régimen de dosificación de la IL-2 de dos niveles, en el que se proporciona al sujeto un periodo de tiempo sin administrar IL-2 y, opcionalmente, un periodo de tiempo sin dosificación del anticuerpo anti-CD40, entre el primero y el segundo periodo de tiempo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles. La terapia concurrente con estos dos agentes terapéuticos puede comprender administrar uno o más ciclos de un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles en combinación con el régimen de dosificación recomendado para el anticuerpo anti-CD40 antagonista, o el fragmento de unión a antígeno adecuado.

Los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva son útiles para tratar individuos por un cáncer que comprende células neoplásicas que expresan el antígeno de superficie celular CD40. Ejemplos de tales cánceres incluyen, entre otros, tumores sólidos, tales como cáncer de pulmón, de ovarios, de vejiga urinaria, de riñón, de hígado, gástrico, de próstata, de piel y de mama, y sarcomas, y cánceres relacionados con las células B tales como linfomas no Hodgkin (linfomas de grado alto, linfomas de grado intermedio y linfomas de grado bajo), la enfermedad de Hodgkin, leucemias linfoblásticas agudas, mielomas, leucemias linfocíticas crónicas y leucemias mieloblásticas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 presenta las secuencias de aminoácidos para las cadenas ligeras y pesadas del mAb CHIR-12.12. Las regiones líder (residuos 1-20 de SEC ID N° 2), variable (residuos 21-132 de SEC ID N° 2), y constante (residuos 133-239 de SEC ID N° 2) de la cadena ligera se muestran en la Figura 1A. Las regiones líder (residuos 1-19 de SEC ID N° 4), variable (residuos 20-139 de SEC ID N° 4), y constante (residuos 140-469 de SEC ID N° 4) de la cadena pesada se muestran en la Figura 1B. La región constante alternativa para la cadena pesada del mAb CHIR-12.12 mostrada en la Figura 1B refleja una sustitución de un residuo de serina por un residuo de alanina en la posición 153 de SEC ID N° 4. La secuencia completa para esta variante de la cadena pesada del mAb CHIR-12.12 se presenta en SEC ID N° 5.

La Figura 2 muestra la secuencia codificadora para la cadena ligera (Figura 2A; SEC ID N° 1) y la cadena pesada (Figura 2B; SEC ID N° 3) para el mAb CHIR-12.12.

La Figura 3 presenta las secuencias de aminoácidos para las cadenas ligera y pesada del mAb CHIR-5.9. Las regiones líder (residuos 1-20 de SEC ID N° 6), variable (residuos 21-132 de SEC ID N° 6), y constante (residuos 133-239 de SEC ID N° 6) de la cadena ligera se muestran en la Figura 3A. Las regiones líder (residuos 1-19 de SEC ID N° 7), variable (residuos 20-144 de SEC ID N° 7), y constante (residuos 145-474 de SEC ID N° 7) de la cadena pesada se muestran en la Figura 3B. La región constante alternativa para la cadena pesada del mAb CHIR-5.9 mostrada en la Figura 3B refleja una sustitución de un residuo serina por un residuo alanina en la posición 158 de SEC ID N° 7. La secuencia completa para esta variante de la cadena pesada del mAb CHIR-5.9 se presenta en la SEC ID N° 8.

La Figura 4 muestra la secuencia codificadora (Figura 4A; SEC ID N° 9) para la isoforma corta del CD40 humano (secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 4B; SEC ID N° 10), y la secuencia codificadora (Figura 4C; SEC ID N° 11) para la isoforma larga del CD40 humano (secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 4D; SEC ID N° 12).

La Figura 5 demuestra la actividad antitumoral potenciada *in vivo* del tratamiento de combinación con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 e IL-2 usando un modelo de xenoinjerto de Namalwa de linfoma no Hodgkin (LNH).

La figura 6 muestra la temperatura de fusión térmica de CHIR-12.12 en formulaciones de diferente pH medida por calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Descripción detallada

La presente invención se refiere a procedimientos para tratar a un sujeto humano por cáncer que comprende células neoplásicas que expresan el antígeno CD40, incluidos, entre otros, sólidos, linfomas, como el linfoma de células B, leucemias y mielomas. Los procedimientos comprenden la terapia de combinación con interleucina-2 (IL-2), o su variante biológicamente activa, y al menos un anticuerpo anti-CD40 antagonista, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, cada uno de los cuales se administra de acuerdo con un régimen de dosificación concreto descrito en la presente memoria descriptiva. En algunas formas de realización de la invención, estos regímenes de dosificación se siguen hasta que se suspende en el sujeto la terapia con el anticuerpo anti-CD40, por ejemplo cuando el sujeto exhibe una respuesta completa o exhibe uno o más síntomas de toxicidad por el anticuerpo anti-CD40 o hasta que se retira al sujeto la terapia con IL-2 debido al desarrollo de síntomas de toxicidad por IL-2 indicados a continuación en la presente memoria descriptiva. Cuando se retira al sujeto la terapia con IL-2 debido a toxicidad, la terapia con el anticuerpo anti-CD40 se puede continuar, siguiendo el régimen de dosificación del anticuerpo recomendado, o se puede suspender; y una vez que los síntomas de toxicidad por IL-2 han remitido o se han resuelto, la terapia con IL-2, o la terapia con IL-2 y con el anticuerpo anti-CD40 en la que se ha suspendido la terapia con el anticuerpo, se puede reinstaurar usando el mismo régimen de dosificación con IL-2 y la misma dosis de IL-2, o su variante biológicamente activa, el mismo régimen de dosificación de IL-2 con una dosis menor de este agente terapéutico o un régimen de dosificación de IL-2 diferente al descrito en la presente memoria descriptiva.

En otras formas de realización de la invención, el régimen de dosificación para la terapia con anticuerpo anti-CD40 se sigue durante un periodo de tiempo fijo, por ejemplo de 2 semanas a 16 semanas, y se administra en combinación con un régimen de dosificación de IL-2 descrito en la presente memoria descriptiva, en el que un periodo de tratamiento dado comprende un periodo de tiempo superpuesto durante el que el sujeto está recibiendo la terapia con el anticuerpo anti-CD40 y la terapia con IL-2 de acuerdo con los regímenes de dosificación y las dosis descritas en la presente memoria descriptiva. En dichas formas de realización, generalmente, la duración de la administración del anticuerpo anti-CD20 es de aproximadamente 4 semanas a aproximadamente 12 semanas, incluidas 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 semanas. La duración de la administración de IL-2 es una función del régimen de dosificación de IL-2.

La terapia de combinación con estos dos agentes terapéuticos proporciona actividad antitumoral. Por “actividad antitumoral” se entiende una reducción en el índice de proliferación celular y, por tanto, una disminución del índice de crecimiento de un tumor existente o en un tumor que aparece durante la terapia, y/o la destrucción de células neoplásicas (tumores) o de células neoplásicas recién formadas, y, por tanto, una disminución del tamaño global de un tumor durante la terapia. Los sujetos sometidos a terapia con una combinación de IL-2 (o una variante de la misma) y al menos un anticuerpo anti-CD40 antagonista (o un fragmento de unión a antígeno del mismo) experimentan una respuesta fisiológica que es beneficiosa con respecto al tratamiento de un cáncer que comprende células neoplásicas que expresan el antígeno CD40, incluidos, entre otros, cánceres relacionados con células B y tumores sólidos, como se cita a continuación en la presente memoria descriptiva.

Aunque los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva están dirigidos al tratamiento de un cáncer existente, se reconoce que los procedimientos pueden ser útiles en la prevención adicional de sobrecrecimientos tumorales que surgen durante la terapia. La terapia de combinación con IL-2 (o una variante biológicamente aceptable de la misma) y un anticuerpo anti-CD40 antagonista (o un fragmento de unión a antígeno del mismo) proporciona un beneficio terapéutico que es superior al proporcionado por el uso de cualquiera de estos agentes terapéuticos por separado. Además, estos dos agentes terapéuticos se pueden usar en combinación para tratar tumores que son resistentes al tratamiento con cualquiera de estos agentes por separado (es decir, tratamiento con un único agente), bien como resultado de la resistencia inicial a la terapia con un único anticuerpo o a la terapia con una única citocina, o como resultado de la resistencia que se desarrolla durante uno o más ciclos de tiempo de terapia con el único anticuerpo o la citocina única. En otras formas de realización más, la terapia de combinación con estos dos agentes terapéuticos tiene un efecto terapéutico sinérgico contra los tumores que son resistentes o no resistentes (es decir, respondedores) a la terapia con un único agente.

El término “oncoterapia” se entiende que significa cualquier tratamiento del cáncer, incluidos quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, combinaciones de las mismas, y similares. En la presente memoria descriptiva se hace referencia a los agentes usados en la oncoterapia como “agentes oncoterapéuticos”. El término “inmunoterapia” es aplicable a cualquier terapia del cáncer en la que se modula el sistema inmunológico e incluye administración de citocinas, administración de anticuerpos, administración de antígenos/vacunación, administración de células inmunitarias, refuerzo de células inmunitarias, combinaciones de los mismos y similares.

“Tumor”, según se usa en el presente documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, sea maligno o benigno, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. “Neoplásico”, según se usa en el presente documento, se refiere a cualquier forma de crecimiento celular no regulado o con regulación alterada, ya sea maligno o benigno, que tiene como resultado un crecimiento tisular anormal. Por “célula neoplásica que expresa CD40” se entiende cualquier célula neoplásica, maligna o benigna, que expresa el antígeno de superficie celular CD40. En la técnica se conocen bien procedimientos para detectar la expresión de CD40 en las células e incluyen, entre otros, técnicas de PCR, inmunohistoquímica, citometría de flujo, transferencia de tipo western, ELISA y similares.

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

leucemia, mieloma y tumores sólidos, incluidos, entre otros, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovarios, carcinomas renales, carcinomas hepáticos, carcinomas gástricos, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de piel, sarcomas y similares.

Por “refractario” en el contexto de un cáncer se entiende que el cáncer concreto es resistente, o no responde, a la terapia con un agente terapéutico concreto. Un cáncer puede ser refractario a la terapia con un agente terapéutico concreto desde el inicio del tratamiento con el agente terapéutico concreto (es decir, no responde a la exposición inicial al agente terapéutico) o como resultado de desarrollar resistencia al agente terapéutico, bien durante el curso de un primer periodo de tratamiento con el agente terapéutico o durante un periodo de tratamiento posterior con agente terapéutico.

El término “interleucina-2” (IL-2), como se usa en el presente documento, se refiere a una citocina con un peso molecular indicado en el intervalo de 13.000 a 17.000 dalton (Gillis y Watson (1980) J. Exp. Med. 159:1709) y con un punto isoeléctrico en el intervalo de 6-8,5. La IL-2 se produce de forma natural en las células T normales y está presente en el cuerpo a concentraciones bajas. Morgan y col. (1976) Science 193:1007-1008 describieron por primera vez la IL-2 y originariamente la denominaron factor de crecimiento de células T por su capacidad para inducir la proliferación de linfocitos T estimulados. Los “anticuerpos” y las “inmunoglobulinas” (Ig) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Los términos se usan de forma sinónima. En algunos casos, se puede conocer la especificidad antigénica de la inmunoglobulina.

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

Los términos “anticuerpo monoclonal” y “mAb”, según se usan en el presente documento, se refieren a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones que se dan en la naturaleza que pueden estar presentes en cantidades menores. Según se utiliza en el presente documento “anticuerpo anti CD40” abarca cualquier anticuerpo que reconoce específicamente el antígeno CD40 de superficie celular, incluidos anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos de cadena única y sus fragmentos tales como Fab, F(ab')₂, Fv, y otros fragmentos que retienen la función de unión al antígeno del anticuerpo anti CD40 original. Son de particular interés para la práctica de los procedimientos descritos en el presente documento los anticuerpos anti CD40 o sus fragmentos de unión a antígeno que tienen las propiedades de unión exhibidas por los anticuerpos monoclonales anti CD40 humanos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos en el presente documento más adelante.

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

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

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

El término “región hipervariable” cuando se usa en el presente documento se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión del antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una “región determinante de complementariedad” o “CDR” (es decir, los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat y col. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (5ª ed., Public

Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD) y/o los residuos de un “bucle hipervariable” (es decir, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Clothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917). Los residuos del “marco” o “FR” son los residuos del dominio variable diferentes a los residuos de la región hipervariable, como se considera en el presente documento.

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

“Fv” es el fragmento mínimo del anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento y unión del antígeno completo. Esta región está constituida por un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en estrecha asociación no covalente. En esta configuración, las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión al antígeno sobre la superficie del dímero V_H-V_L. En conjunto, las seis CDR confieren la especificidad de unión al antígeno para el anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una menor afinidad que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (C_H1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi terminal del dominio C_H1 de la cadena pesada, que incluye una o más cisteínas de la región de bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en el presente documento para el Fab' en el que el(los) residuo(s) cisteína de los dominios constantes tiene(n) un grupo tiol libre. Los fragmentos Fab' se producen mediante la reducción del puente disulfuro de la cadena pesada del fragmento F(ab')₂. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

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

Según la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas humanas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 1 e IgA2. Los dominios constantes de las cadenas pesadas que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, epsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras y las configuraciones tridimensionales de las subunidades de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Los isotipos diferentes tienen funciones efectoras diferentes. Por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG3 humanos median la actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC).

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

El término “antagonista” se utiliza en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que bloquea parcial o totalmente, inhibe o neutraliza una actividad biológica de una diana nativa dada a conocer en el presente documento o su transcripción o traducción.

“Vehículos”, según se usa en el presente documento, incluye vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que son no tóxicos para la célula o el mamífero que se expone al mismo a las dosis y concentraciones utilizadas. Frecuentemente, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa de pH tamponado. Ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato, succinato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluido el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (con menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluidos glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN, polietilenglicol (PEG) y Pluronic. La administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos incluye la administración simultánea (al mismo tiempo) y consecutiva (es decir, secuencial) en cualquier orden.

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

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

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

El término “sinergia” se usa para describir un efecto combinado de dos o más agentes activos que es superior a la suma de los efectos individuales de cada agente activo respectivo. Por tanto, cuando el efecto combinado de dos o más agentes tiene como resultado una “inhibición sinérgica” de una actividad o proceso, por ejemplo el crecimiento tumoral, se entiende que la inhibición de la actividad o proceso es mayor a la suma de los efectos inhibidores de cada agente activo respectivo. El término “efecto terapéutico sinérgico” se refiere a un efecto terapéutico observado con una combinación de dos o más terapias en la que el efecto terapéutico (medido mediante cualquiera de una serie de parámetros) es mayor que la suma de los efectos terapéuticos individuales observados con las terapias individuales respectivas.

Los términos “dosis terapéuticamente eficaz”, “cantidad terapéuticamente eficaz” o “cantidad eficaz” se entiende una cantidad del anticuerpo anti CD40 antagonista (o su fragmento de unión al antígeno) o de interleucina-2 (o su variante) que, cuando se administra como parte de una terapia de combinación que comprende al menos estos dos agentes, da lugar a una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento de un sujeto por un cáncer que comprende células neoplásicas.

Terapia de combinación con anticuerpos anti CD40 antagonistas e IL-2

La presente invención se refiere a procedimientos para tratar a un sujeto que sufre un cáncer caracterizado por crecimiento de células neoplásicas. Los procedimientos dados a conocer en el presente documento abarcan una terapia de combinación con un anticuerpo anti CD40 antagonista, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, e IL-2 o una variante biológicamente activa de la misma. Los procedimientos descritos en el presente documento son especialmente útiles para el tratamiento de cánceres que comprenden células neoplásicas que expresan el antígeno de superficie CD40, tal como muchos tumores sólidos y linfomas de células B.

Los tumores sólidos que se pueden tratar usando los procedimientos descritos en el presente documento incluyen, entre otros, cáncer de ovarios, de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas del los tipos de carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma de células grandes, y cáncer de pulmón de células pequeñas), de mama, de colon, renal (incluidos, por ejemplo, los carcinomas de células renales), de vejiga urinaria, de hígado (incluidos, por ejemplo, los carcinomas hepatocelulares), gástrico, cervical, próstata, nasofaríngeo, tiroideo (por ejemplo, carcinoma papilar tiroideo) y de piel, tal como melanoma, y sarcomas (incluidos, por ejemplo, osteosarcomas y sarcomas de Ewing). Los cánceres relacionados con las células B, tales como linfomas, incluyen linfomas de células B de grado bajo, intermedio y alto, linfomas inmunoblásticos, linfomas no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, linfomas inducidos por el virus de Epstein Barr (EBV) y linfomas relacionados con el SIDA, así como leucemias agudas de células B, mielomas, leucemias linfocíticas crónicas, leucemias mieloblásticas agudas, y similares, como se indica en el presente documento a continuación.

Por tanto, los procedimientos dados a conocer en el presente documento encuentran utilidad en el tratamiento de linfomas no Hodgkin relacionados con la proliferación o acumulación anormal, incontrolable de células B. Para

los fines de la presente invención, se hará referencia a tales linfomas según el esquema de clasificación de *Working Formulation*, es decir los linfomas de células B clasificados como grado bajo, grado intermedio y grado alto (véase “The Non-Hodgkin’s Lymphoma Pathologic Classification Project”, Cancer 49 (1982): 2112-2135). Por consiguiente, los linfomas de células B de grado bajo incluyen los linfomas linfocíticos de células pequeñas, linfomas foliculares de células pequeñas hendidas y linfomas foliculares mixtos de células hendidas pequeñas y grandes; los linfomas de grado intermedio incluyen linfomas foliculares de células grandes, linfomas difusos de células pequeñas hendidas, linfomas difusos mixtos de células pequeñas y grandes y linfomas difusos de células grandes; y los linfomas de grado alto incluyen linfomas inmunoblásticos de células grandes, linfomas linfoblásticos y linfomas de células pequeñas no hendidas del tipo Burkitt y no Burkitt.

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

En particular, los procedimientos dados a conocer en el presente documento son útiles para tratar tumores sólidos que comprenden células neoplásicas que expresan el antígeno CD40 y linfomas de células B, incluidos los que se han indicado en lo que antecede. En el presente documento se define “tratamiento” como la aplicación o administración de un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno a un sujeto, o la aplicación o administración de un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno a un tejido aislado o línea celular de un sujeto, en combinación con la aplicación o administración de IL-2 (o una variante biológicamente activa de la misma) al sujeto o a un tejido o línea celular aislado del sujeto, en el caso de un sujeto que tiene una enfermedad, un síntoma de una enfermedad o una predisposición hacia una enfermedad, en el que el objetivo es curar, sanar, calmar, aliviar, alterar, remediar, atenuar, mejorar o afectar la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición hacia la enfermedad. Por “tratamiento” también se entiende la combinación del anticuerpo anti-CD40 antagonista (o su fragmento de unión al antígeno) e IL-2 (o una variante biológicamente activa de la misma) que se puede aplicar o administrar al sujeto, o al tejido o línea celular aislado del sujeto, como parte de una única composición farmacéutica o, como alternativa, como parte de composiciones farmacéuticas individuales, en las que cada una comprende bien el anticuerpo anti-CD40 antagonista (o su fragmento de unión al antígeno) o IL-2 (o una variante biológicamente activa de la misma), en el caso de que el sujeto tiene una enfermedad, un síntoma de una enfermedad o una predisposición hacia una enfermedad, en el que el objetivo es curar, sanar, calmar, aliviar, alterar, remediar, atenuar, mejorar o afectar la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición hacia la enfermedad.

Breve descripción de los agentes oncoterapéuticos

Los anticuerpos anti CD40 antagonistas adecuados para uso en los procedimientos dados a conocer en el presente documento se unen específicamente a un antígeno CD40 humano expresado en la superficie de una célula humana y están exentos de actividad agonista significativa pero exhiben actividad antagonista cuando se unen al antígeno CD40 en la célula humana que expresa CD40, incluidas células humanas normales y neoplásicas (malignas o benignas). En algunas formas de realización, su unión al CD40 mostrado sobre la superficie de células humanas tiene como resultado la inhibición de la proliferación y diferenciación de estas células humanas. Por tanto, los anticuerpos anti CD40 antagonistas adecuados para usar en los procedimientos descritos en el presente documento incluyen anticuerpos monoclonales que exhiben actividad antagonista hacia las células humanas normales y neoplásicas que expresan el antígeno CD40 de superficie celular. Estos anticuerpos anti CD40 y sus fragmentos de unión a antígeno se denominan en el presente documento “anticuerpos anti CD40 antagonistas”. Dichos anticuerpos incluyen, entre otros, los anticuerpos monoclonales completamente humanos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 que se describen a continuación y los anticuerpos monoclonales que tienen las características de unión de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12. Estos anticuerpos monoclonales, que se pueden producir de forma recombinante, se describen a continuación.

Además de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12, otros anticuerpos anti CD40 que serían útiles en la práctica de los procedimientos descritos en el presente documento incluyen, entre otros; (1) los anticuerpos monoclonales producidos por las líneas celulares de hibridoma denominadas 131.2F8.5.9 (a la que se hace referencia en el presente documento como línea celular 5.9) y 153.8E2.D10.D6.12.12 (a la que se hace referencia en el presente documento como línea celular 12.12), depositadas en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 y Depósito de Patente N° PTA-5543, respectivamente; (2) un anticuerpo monoclonal comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia mostrada en SEC ID N° 2, la secuencia mostrada en SEC ID N° 4, la secuencia mostrada en SEC ID N° 5, las secuencias mostradas SEC ID N° 2 y SEC ID N° 4, y las secuencias mostradas en SEC ID N° 2 y SEC ID N° 5; (3) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos

seleccionada del grupo constituido por la secuencia mostrada en SEC ID N° 6, la secuencia mostrada en la SEC ID N° 7, la secuencia mostrada en la SEC ID N° 8, las secuencias mostradas en las SEC ID N° 6 y SEC ID N° 7, y las secuencias mostradas en las SEC ID N° 6 y SEC ID N° 8; (4) un anticuerpo monoclonal que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID N° 1, la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID N° 3, y las secuencias mostradas en SEQ ID N° 1 y SEC ID N° 3; (5) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 5.9 o la línea celular de hibridoma 12.12; (6) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 10 o SEC ID N° 12; (7) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR 5.9 o CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitiva; y (8) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento del anticuerpo monoclonal CHIR 5.9 o CHIR-12.12 de unión al antígeno o los anteriores anticuerpos monoclonales en los puntos precedentes (1)-(7), en los que el fragmento retiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno CD40 humano. Los expertos en la técnica reconocen que los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno de los mismos dados a conocer en el presente documento incluyen anticuerpos y sus fragmentos de unión al antígeno que son producidos de manera recombinante usando procedimientos bien conocidos en la técnica y que se describen en el presente documento a continuación, e incluyen, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 que se han producido de manera recombinante.

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

Además de usar los anticuerpos anti CD40 antagonistas mencionados en lo que antecede y descritos más completamente en el presente documento más adelante, los procedimientos descritos en el presente documento se pueden poner en práctica usando anticuerpos que tienen las características de unión de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 y que interfieren de manera competitiva con la unión de estos anticuerpos a sus respectivos antígenos o se unen a los mismos epítopos. Un experto en la técnica podría determinar si un anticuerpo interfiere de manera competitiva con la unión de CHIR-5.9 o CHIR-12.12 usando procedimientos convencionales.

La IL-2, o su variante biológicamente activa, para usar en los procedimientos descritos en el presente documento, pueden proceder de cualquier fuente pero, preferentemente, es IL-2 recombinante, más particularmente IL-2 humana recombinante. Por “IL-2 recombinante” se entiende IL-2 que tiene actividad biológica comparable con la IL-2 de secuencia nativa y que se ha preparado mediante técnicas de ADN recombinante tal como han descrito, por ejemplo, Taniguchi y col. (1983) *Nature* 302:305-310 y Devos (1983) *Nucleic Acids Res.* 11: 4307-4323 o IL-2 alterada mediante mutaciones tal como han descrito Wang y col. (1984) *Science* 224:1431-1433. En general, el gen que codifica la IL-2 se clona y, después, se expresa en organismos transformados, preferentemente un microorganismo, por ejemplo *E. coli*, tal como se describe en el presente documento. El organismo huésped expresa el gen extraño para producir IL-2 en condiciones de expresión. La IL-2 recombinante sintética también se puede producir en eucariotas, tales como levaduras o células humanas. Los procedimientos para el crecimiento, la recolección, fragmentación o extracción de la IL-2 de las células se describen sustancialmente en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 4.604.377; 4.738.927; 4.656.132; 4.569.790; 4.748.234; 4.530.787; 4.572.798; 4.748.234; y 4.931.543.

Para ejemplos de proteínas IL-2 variantes, véase la solicitud de patente europea EP 0136489; la solicitud de patente europea EP 0091539; la solicitud de patente europea EP 0088195; las muteínas recombinantes de IL-2 descritas en la solicitud de patente europea EP 0109748, que es la equivalente a la patente belga n° 893.016, la patente de EE.UU. de propiedad común n° 4.518.584; las muteínas descritas en la patente de EE.UU. n° 4.752.585 y el documento WO 99/60128; y la muteína de IL-2 des-alanil-1, serina-125 IL-2 humana (también denominada “aldesleukina”) usada en los ejemplos del presente documento y descrita en la patente de EE.UU. n° 4.931.543, así como las otras muteínas de IL-2 descritas en la presente patente de EE.UU. Adicionalmente, la IL-2 se puede modificar con polietilenglicol para proporcionar mayor solubilidad y un perfil farmacocinético alterado (véase la patente de EE.UU. n° 4.766.106). Véase también a continuación, donde se tratan más completamente las variantes adecuadas de la IL-2.

En algunas formas de realización, los procedimientos descritos en el presente documento comprenden la terapia de combinación con IL-2, por ejemplo IL-2 humana, y el anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR-12.12. En otras formas de realización, los procedimientos descritos en el presente documento comprenden la terapia de combinación con IL-2, por ejemplo IL-2 humana, y el anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR-5.9. En otras formas de realización más, los procedimientos descritos en el presente documento comprenden la terapia de combinación con IL-2, por ejemplo IL-2 humana, y un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR-12.12 o CHIR-5.9.

En formas de realización alternativas, los procedimientos descritos en el presente documento comprenden la terapia de combinación con una variante biológicamente activa de la IL-2, por ejemplo la muteína de la IL-2 des-alanil-1, serina-125 IL-2 humana (También denominada “aldesleukina”, que está disponible comercialmente como una

formulación comercializada con la marca Proleukin® (Chiron Corporation, Emeryville, California)), y el anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR-12.12 o CHIR-5.9. En otras formas de realización más, los procedimientos descritos en el presente documento comprenden la terapia de combinación con una variante biológicamente activa de la IL-2, por ejemplo la muteína de la IL-2 des-alanil-1, serina-125 IL-2 humana IL-2 humana, y un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR-12.12 o CHIR-5.9. La terapia de combinación descrita en el presente documento puede comprender otras variaciones, siempre que se dirijan al antígeno CD40 en el procedimiento de tratamiento.

Mediciones de la eficacia clínica

De conformidad con los procedimientos dados a conocer en el presente documento, la IL-2 o una variante biológicamente activa de la misma y al menos un anticuerpo anti CD40 antagonista, o su fragmento de unión al antígeno, tal como se define en otras partes en el presente documento se utilizan en combinación para estimular una respuesta terapéutica positiva con respecto a un cáncer que comprende células neoplásicas que expresan el antígeno CD40. Por “respuesta terapéutica positiva” se entiende una mejora en la enfermedad asociada con la actividad antitumoral combinada de estos agentes terapéuticos administrados y/o una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad. Por tanto, una respuesta terapéutica positiva se referiría a, por ejemplo, una o más de las siguientes mejoras en la enfermedad: (1) una reducción del tamaño del tumor; (2) una reducción en la cantidad de células cancerosas (es decir, neoplásicas); (3) un incremento de la muerte de las células neoplásicas; (4) inhibición de la supervivencia de las células neoplásicas; (4) inhibición (es decir, retraso en cierta medida, preferentemente detención) del crecimiento tumoral; (5) inhibición (es decir, retraso en cierta medida, preferentemente detención) de la infiltración por células cancerosas de órganos periféricos; (6) inhibición (es decir, retraso en cierta medida, preferentemente detención) de la metástasis tumoral; (7) prevención de otros sobrecrecimientos tumorales; (8) incremento del índice de supervivencia de los pacientes; y (9) algún alivio de uno o más síntomas asociados con el cáncer. Estas respuestas terapéuticas pueden caracterizarse además según el grado de mejora. Por tanto, por ejemplo, una mejora de la enfermedad puede caracterizarse como una respuesta completa. Por “respuesta completa” se entiende la ausencia de enfermedad clínicamente detectable con normalización de cualquier estudio radiográfico, de médula ósea y de líquido cefalorraquídeo (LCR), previamente anormal. Tal respuesta debe persistir durante al menos un mes después del tratamiento según los procedimientos dados a conocer en el presente documento. Una respuesta completa puede no confirmarse si no se realiza una repetición de la evaluación del estado del tumor al menos un mes después de evaluar la respuesta inicial. Como alternativa, una mejora en la enfermedad puede clasificarse como una respuesta parcial. Por “respuesta parcial” se entiende una disminución de al menos el 50% en todas las cargas tumorales que pueden medirse (es decir, la cantidad de células tumorales presentes en el sujeto) en ausencia de nuevas lesiones y que persiste durante al menos un mes. Tal respuesta es aplicable sólo a los tumores que pueden medirse.

Múltiples parámetros pueden ser indicativos de la eficacia del tratamiento. Éstos incluyen, entre otros, una reducción del tamaño de la masa tumoral; una reducción de la capacidad de invasión metastásica del tumor; una reducción de la tasa de crecimiento tumoral; una disminución de la gravedad o la incidencia de las secuelas relacionadas con el tumor, tal como caquexia y producción de ascitis; una disminución y/o prevención de las complicaciones relacionadas con el tumor, tales como fracturas óseas patológicas, anemia hemolítica autoinmunitaria, transformación prolinfocítica y síndrome de Richter, etc.; sensibilización del tumor a quimioterapia y otros tratamientos; un incremento de la tasa de supervivencia del paciente; un incremento de los datos clínicos observados de pronóstico de mejora, tales como incremento de infiltración de linfocitos en el tumor y disminución de la vascularización en el tumor; y similares. Por tanto, en algunas formas de realización, la administración de la combinación terapéutica tendrá como resultado una mejora de uno o más de estos parámetros en un paciente (es decir, sujeto) sometido a tratamiento. En otras formas de realización, las mejoras en el paciente serán sinérgicas con respecto a algunos parámetros, pero aditivas con respecto a otros.

La respuesta del tumor puede evaluarse según los cambios en la morfología del tumor (es decir, carga general del tumor, tamaño del tumor y similares) utilizando técnicas de detección tales como resonancia magnética (RM), imágenes de rayos x, tomografía computerizada (TC), citometría de flujo o análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), imágenes bioluminiscentes, por ejemplo, imágenes con luciferasa, imágenes de gammagrafía ósea y recogida de muestras de biopsias de tumor, incluyendo la aspiración de médula ósea (AMO). Además de estas respuestas terapéuticas positivas, el sujeto que se somete a terapia puede experimentar el efecto beneficioso de una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad. Por consiguiente, para los tumores de células B, el sujeto puede experimentar una disminución en los llamados síntomas B, es decir, los sudores nocturnos, la fiebre, la pérdida de peso y/o la urticaria.

Un procedimiento para predecir la eficacia clínica es medir los efectos de la terapia de combinación con estos dos agentes terapéuticos en un modelo adecuado, por ejemplo el uso de la combinación de IL-2 o una variante biológicamente activa de la misma, y un anticuerpo anti CD40 antagonista, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en uno o más modelos de cáncer murino. Para los linfomas, estos modelos incluyen, por ejemplo, los modelos de xenoinjerto de tumores en ratón desnudo tales como los que usan líneas celulares de linfoma de Burkitt humanas conocidas como Namalwa y Daudi. Por tanto, en algunas formas de realización, la actividad antitumoral de la combinación de estos dos agentes terapéuticos se analiza en un modelo de xenoinjerto de Namalwa NHL humano tal como se describe en los ejemplos del presente documento a continuación. La línea celular de Namalwa da lugar a tumores agresivos resistentes a rituximab cuando se implantan en ratones desnudos.

En otras formas de realización, actividad antitumoral de la combinación de estos dos agentes terapéuticos se analiza en un modelo de xenoinjerto de tumor estadificado en ratón desnudo usando la línea celular de linfoma Daudi. Generalmente, un modelo de xenoinjerto de tumor estadificado es más eficaz para distinguir la eficacia terapéutica de un protocolo terapéutico dado que un modelo no estadificado, ya que en el modelo estadificado la dosis terapéutica se inicia sólo después de que el tumor haya alcanzado un tamaño que puede medirse. En el modelo no estadificado, la dosis terapéutica se inicia, por lo general, en un plazo de aproximadamente 1 día de la inoculación del tumor y antes de que esté presente el tumor palpable. La capacidad de un régimen terapéutico de combinación para exhibir actividad antitumoral aumentada en un modelo estadificado es una fuerte indicación de que el régimen terapéutico de combinación será más eficaz en términos terapéuticos.

En la técnica se conocen bien otros modelos tumorales. Por ejemplo, para el mieloma múltiple (MM), los modelos tumorales incluyen, entre otros, aquéllos en los que las líneas celulares se cultivan en ratones inmunodeficientes y, después, los ratones se tratan con las terapéuticas de interés, y aquéllos en los que las células de mieloma del paciente se implantan junto con hueso fetal en ratones inmunodeficientes y, después, los ratones se tratan con las terapéuticas de interés. Por tanto, por ejemplo, la actividad antitumoral de la combinación de estos dos agentes terapéuticos se puede analizar *in vivo* en un modelo de xenoinjerto de MM IM-9, que usa la línea celular de MM humano IM-9. De este modo, la eficacia de la terapia de combinación con IL-2, o su variante biológicamente activa, y un anticuerpo anti CD40 antagonista o un fragmento de unión a antígeno del mismo se puede evaluar usando un modelo de supervivencia condicionado no estadificado, en el que el tratamiento con estos agentes terapéuticos comienza un día después de la inoculación intravenosa de las células tumorales IM-9. Como alternativa, la eficacia de esta terapia de combinación se puede evaluar usando un modelo subcutáneo estadificado, en el que las células IM9- se inyecta SC en ratones SCID y, después, comienza el tratamiento de combinación con estos agentes terapéuticos una vez que el tumor alcanza un tamaño que se puede medir.

La actividad antitumoral de la terapia de combinación con IL-2 o una variante biológicamente activa de la misma y un anticuerpo anti CD40 antagonista o un fragmento de unión a antígeno del mismo se puede evaluar en un modelo de tumor sólido murino. Entre los ejemplos se incluyen un modelo de xenoinjerto de cáncer de colon usando la línea celular de carcinoma de colon humano HCT 116, que expresa CD40; un modelo murino ortópico no estadificado (profiláctico) de cáncer de ovarios usando la línea celular de cáncer de ovarios SKOV3i.p.1; y un modelo murino estadificado (terapéutico) de cáncer de ovarios usando la línea celular de cáncer de ovarios SKOV3i.p.1.

Modos de administración

Para los fines de llevar a cabo la terapia de combinación descrita en el presente documento, las composiciones farmacéuticas que comprenden estas dos clases de agentes terapéuticos (es decir, la citoquina y el anticuerpo anti CD40 o) como componentes terapéuticamente activos se pueden administrar usando cualquier procedimiento aceptable conocido en la técnica. Por tanto, por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende IL-2 (o una variante biológicamente activa de la misma) o una composición farmacéutica que comprende IL-2 (o una variante de la misma) y el anticuerpo anti CD40 antagonista (o, su fragmento de unión a antígeno) se puede administrar por medio de cualquier forma de inyección, incluida las inyecciones intravenosa (IV), intratumoral (IT), intraperitoneal (IP), intramuscular (IM) o subcutánea (SC). En algunas formas de realización, una composición farmacéutica que comprende IL-2 (o una variante biológicamente activa de la misma) se administra mediante inyección IV, IM, IP o SC y una composición farmacéutica que comprende anticuerpo anti CD40 antagonista (o, su fragmento de unión a antígeno) se administra mediante inyección IV, IP o SC. En otras formas de realización, una composición farmacéutica que comprende IL-2 (o una variante biológicamente activa de la misma) se administra mediante inyección IV, IT o SC, y una composición farmacéutica que comprende anticuerpo anti CD40 antagonista (o, su fragmento de unión a antígeno) se administra mediante inyección IV o SC.

En formas de realización descritas en el presente documento, una composición farmacéutica que comprende IL-2 o una variante de la misma se administra mediante inyección SC y una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o, su fragmento de unión a antígeno se administra por vía intravenosa. Cuando se administra por vía intravenosa, la farmacéutica que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o, su fragmento de unión a antígeno se puede administrar mediante infusión durante un período de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10 horas. En algunas formas de realización, la infusión se produce durante un periodo de aproximadamente a hasta aproximadamente 8 horas, durante un periodo de aproximadamente 3 hasta aproximadamente 7 horas, durante un periodo de aproximadamente 4 hasta aproximadamente 6 horas, o durante un periodo de aproximadamente 6 horas, dependiendo del anticuerpo anti CD40 antagonista que se administrase administrando.

Terapia de combinación

Los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva comprenden usar terapia de combinación. El término “combinación” se usa en su sentido más amplio y significa que un sujeto es tratado con al menos dos regímenes terapéuticos. Por tanto, la “terapia de combinación” se entiende que quiere decir que un sujeto es tratado con al menos dos regímenes oncoterapéuticos, más particularmente con al menos IL-2 o su variante biológicamente activa en combinación con al menos un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión a antígeno, pero el momento de la administración de los diferentes regímenes oncoterapéuticos se puede variar siempre que se consigan los efectos beneficiosos de la combinación de estos dos agentes terapéuticos.

El tratamiento con IL-2 o su variante biológicamente activa en combinación con un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión a antígeno puede ser simultáneo (concurrente), consecutivo (secuencial, en cualquier orden) o una combinación de ambos. Por tanto, un sujeto tratado con una terapia de combinación puede recibir tratamiento con ambos agentes terapéuticos a la vez (es decir, simultáneamente) o en momentos diferentes (es decir, secuencialmente, en cualquier orden, el mismo día o en días diferentes), siempre que se produzca el efecto terapéutico de la combinación de ambas sustancias en el sujeto sometido a terapia. En algunas formas de realización, la combinación de IL-2 o su variante biológicamente activa y el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión a antígeno se administrarán de forma simultánea para una dosificación, pero otras dosificaciones incluirán administración secuencial, en cualquier orden, el mismo día o en días diferentes. La administración secuencial puede realizarse con independencia de si el sujeto responde o no al primer agente terapéutico administrado. Cuando estos dos agentes terapéuticos se administran simultáneamente, se pueden administrar como composiciones farmacéuticas separadas, en la que cada una comprende la IL-2 (o su variante biológicamente activa) o el anticuerpo anti CD40 antagonista (o su fragmento de unión a antígeno), o pueden administrarse en forma de una única composición farmacéutica que comprenden ambos agentes terapéuticos.

El efecto de la terapia de combinación también se puede optimizar variando el momento de la administración de IL-2 (o su variante biológicamente activa) y/o el anticuerpo anti CD40 antagonista (o su fragmento de unión a antígeno). Por tanto, en algunas formas de realización, la IL-2 (o su variante biológicamente activa, tal como la muteína de IL-2 des-alanil C125S humana) se administrará simultáneamente con el anticuerpo anti CD40 antagonista, tal como el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 (o su fragmento de unión a antígeno). En otras formas de realización, la IL-2 (o su variante biológicamente activa, tal como la muteína de IL-2 des-alanil C125S humana) se administrará primero y después se administrará el anticuerpo anti CD40 antagonista, tal como el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 (o su fragmento de unión a antígeno). En otras formas de realización más, el anticuerpo anti CD40 antagonista, tal como el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 (o su fragmento de unión a antígeno) se administrará primero y la IL-2 (o su variante biológicamente activa, tal como la muteína de IL-2 des-alanil C125S humana) se administrará después. En algunas formas de realización, la combinación de la IL-2 (o su variante biológicamente activa, tal como la muteína de IL-2 des-alanil C125S humana) y el anticuerpo anti CD40 antagonista, tal como el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 (o su fragmento de unión a antígeno) se administrarán de forma concurrente para una dosificación, pero otras dosificaciones incluirán administración secuencial, en cualquier orden, el mismo día o en días diferentes. Como se ha indicado previamente, cuando la IL-2 (o su variante biológicamente activa, tal como la muteína de IL-2 des-alanil C125S humana) y el anticuerpo anti CD40 antagonista, tal como el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 (o su fragmento de unión a antígeno) se administran de forma simultánea, se pueden administrar en forma de composiciones farmacéuticas separadas, en las que cada una comprende la IL-2 (o su variante biológicamente activa) o el anticuerpo anti CD40 antagonista (o su fragmento de unión a antígeno), o pueden administrarse en forma de una única composición farmacéutica que comprende ambos agentes terapéuticos.

La terapia con una cantidad eficaz de la combinación de IL-2 (o su variante biológicamente activa) y al menos un anticuerpo anti CD40 antagonista (o su fragmento de unión a antígeno) estimula una respuesta terapéutica positiva para un cáncer que comprende células neoplásicas que expresan el antígeno CD40, incluidos linfomas relacionados con células B y tumores sólidos tal como se han definido en otras partes del presente documento. La terapia concurrente con estos dos agentes antitumorales potencia la actividad antitumoral de cada uno de estos agentes, de modo que proporciona una respuesta terapéutica positiva mejorada con respecto a la observada con la administración de IL-2 (o su variante biológicamente activa) sola o la administración del anticuerpo anti CD40 antagonista (o su fragmento de unión a antígeno) solo. La mejora de la respuesta terapéutica positiva puede ser de naturaleza aditiva o de naturaleza sinérgica. Cuando es sinérgica, la terapia concurrente con IL-2 (o su variante biológicamente activa) y al menos un anticuerpo anti CD40 antagonista (o su fragmento de unión a antígeno) tiene como resultado una respuesta terapéutica positiva que es mayor que la suma de las respuestas terapéuticas positivas conseguidas con los componentes IL-2 (o su variante biológicamente activa) y anticuerpo anti CD40 antagonista (o su fragmento de unión a antígeno) por separado.

Además, el tratamiento se puede conseguir con varias dosis así como regímenes de dosificación, siempre que la combinación de estas dosis sea eficaz en el tratamiento de uno cualquiera o más de una serie de parámetros terapéuticos. Estos regímenes terapéuticos se basan en dosis y programas de dosificación que maximizan los efectos terapéuticos, tales como los que se describen más adelante. Los expertos en la técnica reconocen que una dosis de un anticuerpo monoclonal cualquiera o una citocina cualquiera, como la IL-2, puede no ser terapéuticamente eficaz cuando se administra de forma individual, pero será terapéuticamente eficaz cuando se administra en combinación con el otro agente. Por tanto, en algunas formas de realización, la dosis terapéuticamente eficaz de una combinación de IL-2 y anticuerpo anti CD40 antagonista puede comprender dosis de agentes activos individuales que, cuando se administran solos, no serían terapéuticamente eficaces o serían menos terapéuticamente eficaces que cuando se administran combinados.

Dado que la administración combinada de estos dos agentes terapéuticos potencia la eficacia de ambos agentes, se puede conseguir una respuesta terapéutica positiva que es similar a la conseguida con una dosis concreta de IL-2 sola con menores dosis de este agente. El significado de esto es doble. En primer lugar, los posibles beneficios terapéuticos del tratamiento de neoplasias malignas de células B o de tumores sólidos con IL-2 o una variante de la misma se pueden conseguir a dosis de IL-2 que minimizan las respuestas de toxicidad normalmente asociadas con dosis altas de administración de IL-2. Estas respuestas de toxicidad incluyen, entre otras, fatiga crónica, náuseas, hipotensión, fiebre,

escalofríos, ganancia de peso, prurito o exantema, disnea, azoemia, confusión, trombocitopenia, infarto de miocardio, toxicidad gastrointestinal y síndrome de fuga vascular (véase, por ejemplo, Allison y col. (1989) J. Clin. Oncol. 7 (1):75-80). En segundo lugar, apuntar los anticuerpos monoclonales a moléculas específicas sobre la superficie de las células tumorales puede seleccionar clones que no son reconocidos por el anticuerpo o que no se ven afectados por su unión, lo que tiene como resultado el escape del tumor y la pérdida de tratamiento terapéutico eficaz. La mejor actividad antitumoral del anticuerpo anti CD40 antagonista (o un fragmento del mismo) administrado en combinación con IL-2 (o una variante de la misma) se puede traducir en un incremento de la potencia de los anticuerpos monoclonales, administración menos frecuente de anticuerpos monoclonales y/o dosis menores de anticuerpos monoclonales, de modo que se reduce el potencial de escape del tumor. Además, la actividad ADCC del anticuerpo monoclonal también se puede producir a partir de la actividad de la población de neutrófilos y monocitos/macrófagos. Véase, por ejemplo, Hernández-Ilizaliturri y col. (2003) Clin. Cancer Res. 9(16, Pt 1):5866-5873; y Uchida y col. (2004) J. Exp. Med. 199(12):1659-1669). Dado que se sabe que la IL-2 activa estas poblaciones celulares, la terapia de combinación del anticuerpo anti CD40 antagonista con IL-2 o una variante biológicamente activa de la misma puede mejorar la actividad antitumoral mediada por ADCC del anticuerpo.

Un experto en la técnica puede determinar fácilmente sin excesiva experimentación dada la divulgación expuesta en el presente documento la cantidad de al menos un anticuerpo anti CD40 antagonista (o su fragmento de unión a antígeno) a administrar en combinación con una cantidad de IL-2 (o su variante) y la cantidad de estos agentes terapéuticos necesaria para potenciar la eficacia del otro agente terapéutico. Los factores que influyen en el modo de administración y la respectiva cantidad de IL-2 (o su variante) y del anticuerpo anti CD40 antagonista (o su fragmento de unión al mismo) administrados en combinación incluyen, entre otros, el linfoma o tumor sólido concreto que se somete a terapia, la gravedad de la enfermedad, la historia de la enfermedad, y la edad, altura, peso, salud y condición física del individuo que se somete al tratamiento. De manera similar, la cantidad de estos agentes terapéuticos a administrar en combinación dependerá del modo de administración y de si el sujeto se someterá a una monodosis o a dosis múltiples de estos agentes terapéuticos. Por lo general, al aumentar el peso del sujeto sometido al tratamiento, resulta de preferencia una dosis más alta del agente anticuerpo.

Ejemplos de protocolos para la terapia de combinación con IL-2/anticuerpo anti CD40 antagonista

En algunas formas de realización de la divulgación, la terapia de combinación se consigue mediante la administración de la dosis semanal total recomendada de una composición farmacéutica que comprende IL-2 (o su variante biológicamente activa) en combinación con la dosis terapéuticamente eficaz recomendada de una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista (o su fragmento de unión del mismo), administrándose cada una de acuerdo con un régimen de dosificación concreto. Por “dosis o cantidad terapéuticamente eficaz” se entiende una cantidad de uno de estos dos agentes terapéuticos que, cuando se administran con una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz con la otra de estos dos agentes terapéuticos da lugar a una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento de cánceres que comprenden células neoplásicas que expresan el antígeno de superficie celular CD40. Como se ha indicado en lo que antecede, la administración de las composiciones farmacéuticas por separado puede ser a la vez o en momentos diferentes, siempre que se produzca el efecto terapéutico de la combinación de ambas sustancias en el sujeto sometido a terapia. De acuerdo con algunas formas de realización de la divulgación, al sujeto humano sometido a tratamiento con una o más dosis semanales del anticuerpo anti CD40 antagonista, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como se define en el presente documento más adelante también se le administra IL-2, o una variante biológicamente activa de la misma, como se define en el presente documento más adelante de acuerdo con un régimen de dosificación de IL-2 constante o de acuerdo con un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles. Un importante aspecto de esta terapia de combinación es un periodo de tiempo de solapamiento durante el cual se está administrando al sujeto los dos agentes terapéuticos, cada uno de acuerdo con el régimen de dosificación concreto divulgado en el presente documento. De acuerdo con esto, cuando la terapia de combinación comprende este tiempo de solapamiento de la dosificación con estos dos agentes terapéuticos, la terapia de combinación también se denomina “terapia concurrente”. La primera dosis terapéuticamente eficaz administrada al sujeto puede ser el anticuerpo anti CD40 antagonista (o un fragmento de unión a antígeno del mismo) o puede ser la IL-2 (o una variante biológicamente activa de la misma). Los días en los que está programada la administración al sujeto de ambos agentes, el anticuerpo anti CD40 antagonista (o un fragmento de unión a antígeno del mismo) y la IL-2 (o una variante biológicamente activa de la misma), estos agentes terapéuticos se pueden administrar a la vez (es decir, administración simultánea) o en momentos diferentes (es decir, administración secuencial, en cualquier orden). Aunque los comentarios siguientes sobre los regímenes de dosificación preferidos se refieren a la dosificación de un anticuerpo anti CD40 antagonista como se define en el presente documento en combinación con IL-2 como se define en el presente documento, se reconoce que los protocolos (es decir, inicio del tratamiento, duración del tratamiento con anticuerpo e IL-2, regímenes de dosificación del anticuerpo y la IL-2, interrupción de la dosificación de IL-2, ciclos posteriores de terapia de combinación con IL-2/anticuerpo anti CD40 antagonista, programa de dosificación de IL-2, y similares) son igualmente aplicables a la dosificación con un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti CD40 antagonista tal como se define en el presente documento en combinación con IL-2 tal como se define en el presente documento, a la dosificación con un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti CD40 antagonista tal como se define en el presente documento en combinación con una variante biológicamente activa de la IL-2 tal como se define en el presente documento o a la dosificación con un anticuerpo anti CD40 antagonista tal como se define en el presente documento en combinación con una variante biológicamente activa de la IL-2 tal como se define en el presente documento.

Terapia concurrente: Inicio del tratamiento

5 Cuando la terapia concurrente con IL-2 y un anticuerpo anti CD40 antagonista comprende uno o más ciclos de un régimen de dosificación de IL-2 constante, el agente terapéutico inicial que se va a administrar al sujeto al inicio de un periodo de tratamiento puede ser la IL-2 o el anticuerpo anti CD40 antagonista, siempre que el sujeto tenga un periodo de tiempo de solapamiento durante el cual se administra al sujeto ambos agentes terapéuticos, cada uno de acuerdo con el régimen de dosificación concreto divulgado en el presente documento.

10 Por tanto, en una forma de realización, la terapia concurrente con estos dos agentes terapéuticos comprende inicial el régimen de dosificación de IL-2 constante antes de iniciar la administración de las dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti CD40 antagonista, que se administran semanalmente o, como alternativa, una vez cada dos, tres o cuatro semanas. De este modo, una primera dosis de IL-2 se administra hasta un mes antes de la primera dosis del anticuerpo anti CD40 antagonista. Por "hasta un mes" se entiende la primera dosis de IL-2 administrada al menos un día antes de iniciar la administración del anticuerpo anti CD40 antagonista, pero no más de un mes (es decir, 30 días) antes de inicial la administración del anticuerpo anti CD40 antagonista. Por tanto, la administración de IL-2 puede comenzar, por ejemplo, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días (es decir 1 semana), 10 días, 14 días (es decir, dos semanas), 17 días, 21 días (es decir, 3 semanas), 24 días, 28 días (4 semanas), o hasta un mes (es decir, 30 ó 31 días) antes de administrar la primera dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista.

20 En otras formas de realización, el régimen de dosificación de IL-2 constante y la administración del anticuerpo anti CD40 antagonista comienzan de forma concurrente el mismo día, bien a la vez (es decir, administración simultánea) o en momentos diferentes (es decir, administración secuencial, en cualquier orden). Por tanto, por ejemplo, en una forma de realización en la que la terapia concurrente con estos dos agentes terapéuticos comienza el día 1 de un periodo de tratamiento, una primera dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista y una primera dosis de IL-2 se administrarían ambos el día 1 de este periodo de tratamiento. En una forma de realización tal, la dosis del anticuerpo anti CD40 antagonista se administra primero, seguida por la administración de la dosis de IL-2 en un plazo de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 4 horas de la finalización de la administración de la dosis del anticuerpo anti CD40 antagonista, tal como en un plazo de aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, o 240 minutos.

30 En formas de realización alternativas, el agente terapéutico inicial que se va a administrar al sujeto al comienzo de un periodo de tratamiento es el anticuerpo anti CD40 antagonista, mientras que el primer ciclo de dosificación de IL-2 constante se inicia mediante la administración de una primera dosis de IL-2 posteriormente, por ejemplo, en un plazo de 10 días tras la administración de la primera dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo en un plazo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 días. En algunas formas de realización, el primer ciclo de dosificación de IL-2 constante se inicia con la administración de una primera dosis de IL-2 en un plazo de 7 días desde la administración de la primera dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista, tal como en un plazo de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días. Por tanto, por ejemplo, en una forma de realización se administra una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista el día 1 de un periodo de tratamiento y el primer ciclo de dosificación de IL-2 constante se inicia 7 días después, es decir mediante la administración de la dosis inicial de IL-2 el día 8 del periodo de tratamiento.

45 Tras la finalización del primer ciclo de dosificación constante de IL-2, se puede administrar a un sujeto humano que está recibiendo dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti CD40 antagonista de acuerdo con un programa de dosificación semanal o, como alternativa, una vez cada dos, tres o cuatro semanas, uno o más ciclos posteriores de la dosificación constante de IL-2. Durante el segundo y los ciclos posteriores de dosificación constante de IL-2, en general, el primer agente terapéutico que se va a administrar al sujeto es el anticuerpo anti CD40 antagonista, iniciándose el segundo o posterior ciclo de dosificación constante de IL-2 mediante la administración de una primera dosis de IL-2 en un plazo de 24 horas, tal como en un plazo de 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, o 24 desde la administración de la dosis del anticuerpo anti CD40 antagonista. Los días en los que está programada la administración al sujeto de ambos agentes, el anticuerpo anti CD40 antagonista y la IL-2, estos agentes terapéuticos se pueden administrar a la vez (es decir, administración simultánea) o en momentos diferentes (es decir, administración secuencial, en cualquier orden). En una forma de realización tal, la dosis del anticuerpo anti CD40 antagonista se administra primero, seguida por la administración de la dosis de IL-2 en un plazo de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 4 horas de la finalización de la administración de la dosis del anticuerpo anti CD40 antagonista, tal como en un plazo de aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, o 240 minutos.

60 Cuando la terapia concurrente con IL-2 y un anticuerpo anti CD40 antagonista comprende uno o más ciclos de un régimen de dosificación de IL2 de dos niveles, el agente terapéutico inicial que se va a administrar al sujeto al inicio de un periodo de tratamiento puede ser la IL-2 o el anticuerpo anti CD40 antagonista, siempre que el sujeto tenga un periodo de tiempo de solapamiento durante el cual se administra al sujeto ambos agentes terapéuticos, cada uno de acuerdo con el régimen de dosificación concreto divulgado en el presente documento.

65 Por tanto, en una forma de realización, la terapia concurrente con estos dos agentes terapéuticos comprende iniciar el régimen de dosificación de IL2 de dos niveles antes de iniciar la administración de dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti CD40 antagonista, en el que una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo se administra de acuerdo con un programa de dosificación semanal o, como alternativa, una vez cada dos, tres o cuatro semanas. De este modo, una primera dosis de IL-2 se administra hasta un mes antes de la primera dosis del anticuerpo anti CD40

antagonista. Por “hasta un mes” se entiende la primera dosis de IL-2 administrada al menos un día antes de iniciar la administración del anticuerpo anti CD40 antagonista, pero no más de un mes (es decir, 30 días) antes de inicial la administración del anticuerpo anti CD40 antagonista. Por tanto, la administración de IL-2 puede comenzar, por ejemplo, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días (es decir 1 semana), 10 días, 14 días (es decir, dos semanas), 17 días, 21 días (es decir, 3 semanas), 24 días, 28 días (4 semanas), o hasta un mes (es decir, 30 ó 31 días) antes de administrar la primera dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista.

En otras formas de realización, el régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles y la administración del anticuerpo anti CD40 antagonista comienzan de forma concurrente el mismo día, bien a la vez (es decir, administración simultánea) o en momentos diferentes (es decir, administración secuencial, en cualquier orden). Por tanto, por ejemplo, en una forma de realización en la que la terapia concurrente con estos dos agentes terapéuticos comienza el día 1 de un periodo de tratamiento, una primera dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista y una primera dosis de IL-2 se administrarían ambos el día 1 de este periodo de tratamiento. En una forma de realización tal, la dosis del anticuerpo anti CD40 antagonista se administra primero, seguida por la administración de la dosis de IL-2 en un plazo de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 4 horas de la finalización de la administración de la dosis del anticuerpo anti CD40 antagonista, tal como en un plazo de aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, o 240 minutos.

En formas de realización alternativas, se administra al sujeto una primera dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo el día 1 de un periodo de tratamiento, y el régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles se inicia mediante la administración de una primera dosis de IL-2 en un plazo de 10 días desde la administración de la primera dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista. En estas formas de realización, preferentemente, el régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles se inicia con la administración de una primera dosis de IL-2 en un plazo de 7 días desde la administración de la primera dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista, tal como en un plazo de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días.

En función de la gravedad de la enfermedad, el estado de salud y la historia previa de la enfermedad del paciente se pueden administrar uno o más ciclos de un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles de forma concurrente con la terapia con el anticuerpo anti CD40 antagonista, en la que las dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo se administran semanalmente o, como alternativa, una vez cada dos, tres o cuatro semanas

Duración del tratamiento con anticuerpo e IL-2

De acuerdo con los procedimientos divulgados en el presente documento, una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista se administra semanalmente o se administra una vez cada dos, tres o cuatro semanas, en combinación con uno o más ciclos de un régimen de dosificación de IL-2 constante o en combinación con uno o más ciclos de un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles. Cuando un sujeto está recibiendo una terapia concurrente con estos dos agentes terapéuticos del modo indicado en el presente documento, la duración de la administración del anticuerpo anti CD40 antagonista y la duración de cualquier ciclo dado de cualquiera de los dos regímenes de dosificación de IL-2 dependerá del estado de salud general del paciente, la historia de la progresión de la enfermedad y la tolerancia del protocolo de administración concreto del anticuerpo anti CD40 antagonista/IL-2.

Por tanto, en algunas formas de realización, las dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti CD40 antagonista se administran semanalmente (es decir, una vez a la semana) o una vez de cada dos a cada cuatro semanas, por ejemplo una vez cada dos semanas, vez cada tres semanas o vez cada cuatro semanas, a lo largo de un periodo de tratamiento, en el que el periodo de tratamiento incluye uno o más ciclos de un régimen de dosificación de IL-2 constante o uno o más ciclos de un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles.

Como alternativa, la terapia con anticuerpo anti CD40 antagonista puede tener una duración fija dentro de un periodo de tratamiento. De este modo, una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista se administra semanalmente o se administra una vez cada dos, tres o cuatro semanas, para un periodo fijo de aproximadamente 4 semanas a aproximadamente 16 semanas, incluidas 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16 semanas, en combinación con uno o más ciclos de un régimen de dosificación de IL-2 constante o en combinación con uno o más ciclos de un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles. Por tanto, por ejemplo, cuando el anticuerpo se administra semanalmente para una duración de 4 semanas u 8 semanas, el sujeto recibirá cuatro u ocho dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti CD40 antagonista, respectivamente, durante la terapia concurrente con IL-2. De forma similar, cuando el anticuerpo se administra una vez cada dos semanas para una duración de 4 semanas u 8 semanas, por ejemplo, el sujeto recibiría dos o cuatro dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti CD40 antagonista, respectivamente, durante la terapia concurrente con IL-2. Cuando el anticuerpo se administra una vez cada tres semanas para una duración de 6 semanas, 9 semanas, 12 semanas o 15 semanas, por ejemplo, el sujeto recibiría dos, tres, cuatro o cinco dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti CD40 antagonista, respectivamente, durante la terapia concurrente con IL-2. De forma similar, cuando el anticuerpo se administra una vez cada cuatro semanas para una duración de 8 semanas, 12 semanas ó 16 semanas, el sujeto recibiría dos, tres o cuatro dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti CD40 antagonista, respectivamente, durante la terapia concurrente con IL-2.

La duración de la administración de IL-2 durante la terapia concurrente con estos dos agentes terapéuticos es una función del régimen de dosificación de IL-2 usado. En general, la IL-2 se administra de acuerdo con los protocolos divulgados, y un sujeto puede repetir uno o más ciclos de un régimen de dosificación de IL-2 constante o de dos niveles

según sea necesario, a menos que se desarrollen síntomas de toxicidad por la IL-2. Si se desarrollan dichos síntomas de toxicidad, se puede retirar al sujeto la dosificación de IL-2 hasta la resolución completa de todos los síntomas de toxicidad observados. Estas respuestas de toxicidad por IL-2 incluyen, entre otras, fatiga crónica, náuseas, hipotensión, fiebre, escalofríos, ganancia de peso, prurito o exantema, disnea, azoemia, confusión, trombocitopenia, infarto de miocardio, toxicidad gastrointestinal y síndrome de fuga vascular (véase, por ejemplo, Allison y col. (1989) J. Clin. Oncol. 7 (1):75-80). El sujeto puede continuar con la terapia concurrente con estos dos agentes terapéuticos según sea necesario tras la resolución de los signos y síntomas de estos síntomas de toxicidad por IL-2. La continuación de la terapia concurrente con estos dos agentes terapéuticos puede implicar cualquiera de los protocolos de administración de anticuerpo anti CD40 antagonista/IL-2 divulgados en el presente documento (es decir, anticuerpo anti CD40 antagonista con el régimen de dosificación de IL-2 constante o anticuerpo anti CD40 antagonista con el régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles) en función del estado de salud general del sujeto, el estado de la enfermedad relevante y la tolerancia del protocolo de administración de anticuerpo anti CD40 antagonista/IL-2 concreto.

Régimen de dosificación de IL-2 constante

En algunas formas de realización de la divulgación, al sujeto sometido a la terapia concurrente con estos dos agentes terapéuticos se le administra uno o más ciclos de un régimen de dosificación de IL-2 constante en combinación con el programa de dosificación del anticuerpo anti CD40 antagonista divulgado en el presente documento (es decir, dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti CD40 antagonista administradas o una vez de cada dos, tres o cuatro semanas a lo largo de un periodo de tratamiento o para una duración fija dentro del periodo de tratamiento como se ha indicado en lo que antecede). Por “régimen de dosificación de IL-2 constante” se entiende que al sujeto sometido a la terapia concurrente con IL-2 y un anticuerpo anti CD40 antagonista se le administra una dosis semanal total constante de IL-2 durante el transcurso de cualquier ciclo de administración de IL-2. Un ciclo completo de un régimen de dosificación de IL-2 constante comprende administrar una dosis semanal total constante de IL-2 durante un periodo de aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 12 semanas, tal como de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 semanas, seguido por un periodo de tiempo sin dosificación de IL-2, que tiene una duración de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 4 semanas, incluidas 1, 2, 3 ó 4 semanas. Por tanto, cada ciclo de un régimen de dosificación de IL-2 constante comprende un primer periodo de tiempo durante el cual se administra al sujeto una dosis semanal total constante de IL-2 y un segundo periodo de tiempo durante el cual se suspende la dosificación de IL-2 (es decir, un periodo de “reposo” o “descanso” de la administración de IL-2). Preferentemente, se administra al sujeto la dosis semanal total constante de IL-2 durante de al menos 4 semanas a aproximadamente 12 semanas, momento en el cual se suspende la dosificación de IL-2 durante un periodo de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 4 semanas. Como se ha indicado en lo que antecede en el presente documento, cualquiera de estos agentes terapéuticos se puede administrar primero con el fin de iniciar este protocolo de terapia concurrente.

Cuando el sujeto va a recibir la terapia con anticuerpo anti CD40 antagonista a lo largo de un periodo de tratamiento (es decir, un periodo de tiempo durante el cual el sujeto está recibiendo terapia concurrente con estos dos agentes terapéuticos), durante cada ciclo del régimen de dosificación de IL-2 constante el sujeto permanece con el régimen de dosificación recomendado para el anticuerpo anti CD40 antagonista y, por tanto, recibe una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista de acuerdo con un programa de dosificación semanal o de acuerdo con un programa de dosificación de una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas.

Como alternativa, cuando el sujeto va a recibir la terapia con anticuerpo anti CD40 antagonista a lo largo de un periodo de tratamiento durante un tiempo fijo, el periodo de tratamiento comprende administrar una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista durante un tiempo fijo de aproximadamente 4 semanas a aproximadamente 16 semanas, cuando el anticuerpo se administra una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas, y administrar uno o más ciclos del régimen de dosificación de IL-2 constante. Por tanto, por ejemplo, en algunas formas de realización, se administra al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista una vez a la semana durante un tiempo fijo de 4 semanas u 8 semanas, en combinación con al menos un ciclo de un régimen de dosificación de IL-2 constante. En tales formas de realización, cada ciclo completo del régimen de dosificación de IL-2 constante comprende administrar una dosis semanal total constante de IL-2 durante un periodo de aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 12 semanas, tal como de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 semanas, seguido por un periodo de tiempo sin dosificación de IL-2, que tiene una duración de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 4 semanas, incluidas 1, 2, 3 ó 4 semanas.

A discreción del médico encargado del tratamiento, el sujeto sometido a administración semanal del anticuerpo anti CD40 antagonista o a anticuerpo anti CD40 antagonista una vez cada dos, tres o cuatro semanas, puede continuar recibiendo la dosis semanal total constante de IL-2 durante un periodo extendido de tiempo mayor de 12 semanas, por ejemplo durante 1-8 semanas adicionales, siempre que el protocolo de dosificación de anticuerpo anti CD40 antagonista/IL-2 constante sea bien tolerado y el sujeto exhiba signos mínimos de síntomas de toxicidad bien por el anticuerpo anti CD40 antagonista y/o por la IL-2. En tal forma de realización, a la conclusión de la dosificación de IL-2 le seguiría un periodo de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 4 semanas durante el cual la dosificación de IL-2 se suspendería para permitir que el sujeto descanse de este agente terapéutico antes de iniciar un ciclo posterior del régimen de dosificación de IL-2 constante.

En una forma de realización, se administra a un sujeto que necesita terapia concurrente con el anticuerpo anti CD40 antagonista e IL-2 una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista una vez a la semana a lo largo de un periodo de tratamiento o se administra una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40

antagonista una vez cada tres semanas a lo largo de este periodo de tratamiento, comenzando el día 1 de este periodo de tratamiento, y el primer ciclo de un régimen de dosificación de IL-2 constante se inicia comenzando el día 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 del mismo periodo de tratamiento. En una forma de realización tal, el primer ciclo de un régimen de dosificación de IL-2 constante comienza el día 8 (es decir, a principios de la semana 2) del periodo de tratamiento y tiene una duración de administración de IL-2 de aproximadamente 4 semanas a aproximadamente 12 semanas, seguido por un periodo de tiempo sin administración de IL-2 que tiene una duración de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 4 semanas. Al final de este primer ciclo del régimen de dosificación de IL-2 constante, el sujeto recibe uno o más ciclos posteriores del régimen de dosificación de IL-2 constante como se ha indicado en lo que antecede en el presente documento.

En una forma de realización, se administra al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista una vez a la semana a lo largo de un periodo de tratamiento o se administra una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista una vez cada tres semanas a lo largo de este periodo de tratamiento, comenzando el día 1 de este periodo de tratamiento, y un primer ciclo del régimen de dosificación de IL-2 constante comienza el día 8 (es decir, a principios de la semana 2) del periodo de tratamiento y tiene una duración de administración de IL-2 de 4 semanas, seguido por un periodo de tiempo sin administración de IL-2 que tiene una duración de 1 semana. A discreción del médico encargado del tratamiento, después se administra al sujeto uno o más ciclos posteriores de este régimen de administración de IL-2 constante, es decir administración de la dosis semanal total constante de IL-2 durante 4 semanas, seguido por 1 semana sin administración de IL-2. Durante todo el periodo de tratamiento, el sujeto continúa recibiendo la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista de acuerdo con el programa de dosificación de una vez a la semana, o con el programa de dosificación de una vez cada tres semanas, con la condición de que el sujeto no exhiba síntomas de toxicidad por el anticuerpo anti-CD40 antagonista. Por tanto, por ejemplo, si el sujeto es sometido a tres ciclos del régimen de dosificación de IL-2 constante en combinación con administración semanal (es decir, una vez a la semana) del anticuerpo anti CD40 antagonista, comenzando el primer ciclo de administración de IL-2 el día 8 de un periodo de tratamiento (es decir, el día 1 de la semana 2), a este sujeto las dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti CD40 antagonista se administrarían el día 1 de cada semana de tratamiento (es decir, el día 1 de las semanas 1-16) y una dosis semanal total constante de IL-2 durante las semanas 2-5, las semanas 7-10 y las semanas 12-15, siendo el tiempo de descanso de la dosificación de IL-2 durante las semanas 6, 11 y 16.

En formas de realización alternativas, se administra a un sujeto que necesita terapia concurrente con el anticuerpo anti CD40 antagonista e IL-2 una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista una vez a la semana a lo largo de un periodo de tratamiento o se administra una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista una vez cada dos semanas durante un tiempo fijo de 4 semanas u 8 semanas, comenzando el día 1 de un periodo de tratamiento, y el primer ciclo de un régimen de dosificación de IL-2 constante se inicia comenzando el día 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 del mismo periodo de tratamiento. En una forma de realización tal, el primer ciclo de un régimen de dosificación de IL-2 constante comienza el día 8 (es decir, a principios de la semana 2) del periodo de tratamiento y tiene una duración de administración de IL-2 de aproximadamente 4 semanas a aproximadamente 12 semanas, seguido por un periodo de tiempo sin administración de IL-2 que tiene una duración de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 4 semanas. Al final de este primer ciclo del régimen de dosificación de IL-2 constante, el sujeto recibe uno o más ciclos posteriores del régimen de dosificación de IL-2 constante como se ha indicado en lo que antecede en el presente documento.

En otra forma de realización, se administra al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista una vez a la semana, o una vez cada dos semanas, durante un tiempo fijo de 4 semanas u 8 semanas, comenzando el día 1 de un periodo de tratamiento, y un primer ciclo del régimen de dosificación de IL-2 constante comienza el día 8 (es decir, a principios de la semana 2) del periodo de tratamiento y tiene una duración de administración de IL-2 de 4 semanas, seguido por un periodo de tiempo sin administración de IL-2 que tiene una duración de 1 semana. A discreción del médico encargado del tratamiento, después se administra al sujeto uno o más ciclos posteriores de este régimen de administración de IL-2 constante, es decir administración de la dosis semanal total constante de IL-2 durante 4 semanas, seguido por 1 semana sin administración de IL-2. Por tanto, por ejemplo, si el sujeto es sometido a tres ciclos del régimen de dosificación de IL-2 constante en combinación con administración semanal (es decir, una vez a la semana) del anticuerpo anti CD40 antagonista durante un tiempo fijo de 4 semanas, comenzando el primer ciclo de administración de IL-2 el día 8 de un periodo de tratamiento (es decir, el día 1 de la semana 2), a este sujeto las dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti CD40 antagonista se administrarían el día 1 de las semanas 1-4 del periodo de tratamiento y se administraría una dosis semanal total constante de IL-2 durante las semanas 2-5, las semanas 7-10 y las semanas 12-15, siendo el tiempo de descanso de la dosificación de IL-2 durante las semanas 6, 11 y 16. Como alternativa, si el sujeto es sometido a tres ciclos del régimen de dosificación de IL-2 constante en combinación con administración semanal (es decir, una vez a la semana) del anticuerpo anti CD40 antagonista durante un tiempo fijo de 8 semanas, comenzando el primer ciclo de administración de IL-2 el día 8 de un periodo de tratamiento (es decir, el día 1 de la semana 2), a este sujeto las dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti CD40 antagonista se administrarían el día 1 de las semanas 1-8 del periodo de tratamiento y se administraría una dosis semanal total constante de IL-2 durante las semanas 2-5, las semanas 7-10 y las semanas 12-15, siendo el tiempo de descanso de la dosificación de IL-2 durante las semanas 6, 11 y 16.

Régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles

En otras formas de realización de la divulgación, la terapia concurrente con anticuerpo anti CD40 antagonista e IL-2 comprende administrar una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista una a la semana

o una vez cada dos, tres o cuatro semanas a lo largo de un periodo de tratamiento o para una duración fija dentro del periodo de tratamiento, en combinación con uno o más ciclos de un “régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles” durante el transcurso de este periodo de tratamiento. Por “régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles” se entiende que se administra al sujeto sometido a terapia concurrente con IL-2 y anticuerpo anti CD40 antagonista durante dos periodos de tiempo de dosificación de IL-2, que tienen una duración combinada de aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 16 semanas, incluidas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16. En una forma de realización, el régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles tiene una duración combinada de aproximadamente 4 semanas a aproximadamente 12 semanas; en otras formas de realización, el régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles tiene una duración combinada de aproximadamente 4 semanas a aproximadamente 8 semanas, incluidas aproximadamente 4, 5, 6, 7 u 8 semanas. La dosis semanal total de IL-2 que se va a administrar durante el primero y el segundo periodos de tiempo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles se escoge de tal manera que durante el primer periodo de tiempo se administra una dosis semanal total de IL-2 mayor y durante el segundo periodo de tiempo se administra una dosis semanal total menor.

La duración del primero y el segundo periodos de tiempo individuales de cualquier ciclo dado del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles puede variar en función de la salud del individuo y la historia de la progresión de la enfermedad. En general, se administra al sujeto dosis semanales totales mayores de IL-2 durante al menos 1 semana de las 4 semanas a 16 semanas de régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles. En una forma de realización, dosis semanales totales mayores de IL-2 se administran durante la primera mitad del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles y dosis semanales totales menores se administran durante la segunda mitad del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles. Por tanto, por ejemplo, cuando un ciclo completo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles tiene una duración combinada de 8 semanas, las dosis semanales totales mayores de IL-2 se administrarían durante las primeras 4 semanas de la dosificación de IL-2 y las dosis semanales totales menores de IL-2 se administrarían durante las segundas 4 semanas de la dosificación de IL-2.

Cuando el sujeto va a recibir la terapia con anticuerpo anti CD40 antagonista a lo largo de un periodo de tratamiento (es decir, un periodo de tiempo durante el cual el sujeto está recibiendo terapia concurrente con estos dos agentes terapéuticos), durante cada ciclo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles el sujeto permanece con el régimen de dosificación recomendado para el anticuerpo anti CD40 antagonista y, por tanto, recibe una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista de acuerdo con un programa de dosificación semanal o de acuerdo con un programa de dosificación de una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas.

Como alternativa, cuando el sujeto va a recibir la terapia con anticuerpo anti CD40 antagonista a lo largo de un periodo de tratamiento durante un tiempo fijo, el periodo de tratamiento comprende administrar una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista durante un tiempo fijo de aproximadamente 4 semanas a aproximadamente 16 semanas, cuando el anticuerpo se administra una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas, y administrar uno o más ciclos del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles. Por tanto, por ejemplo, en algunas formas de realización, se administra al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista una vez a la semana durante un tiempo fijo de 4 semanas u 8 semanas, en combinación con al menos un ciclo de un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles, como se ha definido en lo que antecede en el presente documento.

Aunque más adelante en el presente documento se divulgan regímenes de dosificación específicos, se reconoce que la divulgación abarca cualquier protocolo de administración que proporciona la terapia concurrente con un anticuerpo anti CD40 antagonista y uno o más ciclos de un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles que proporciona exposición inicial a dosis semanales totales mayores de IL-2 y la exposición posterior a dosis semanales totales menores de IL-2. Sin quedar ligado a teoría alguna, se cree que administrar una dosis mayor de IL-2 durante las etapas iniciales de la dosificación de IL-2 proporciona una estimulación inicial de actividad celular NK que puede mantenerse con una dosis menor durante las semanas posteriores de dosificación de IL-2. Dado que los efectos secundarios de la IL-2 están relacionados con la dosis, la dosis reducida de IL-2 incrementará la tolerabilidad de este agente terapéutico durante el periodo de tratamiento extendido.

Por tanto, los procedimientos divulgados en el presente documento contemplan regímenes de tratamiento en los que una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti CD40 antagonista se administra una vez a la semana a lo largo de un periodo de tratamiento o se administra una vez cada dos, tres o cuatro semanas a lo largo de este periodo de tratamiento, en combinación con una dosificación de IL-2 de dos niveles que tiene una duración combinada de aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 16 semanas, incluidas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16 semanas. En primer lugar se puede administrar cualquier agente, como se ha explicado en lo que antecede para este régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles. Por ejemplo, en una forma de realización, primero se administra una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo el día 1 de un periodo de tratamiento, seguida por el inicio del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles en un plazo de 10 días, preferentemente en un plazo de 7 días de la primera administración del anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo en un plazo de 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 días. Durante el régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles se administra una dosis semanal total mayor de IL-2 en el primer periodo de tiempo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles, por ejemplo durante las primeras 1-4 semanas de administración de IL-2 y dosis semanales totales menores de IL-2 se administran durante el segundo periodo de tiempo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles (es decir, durante el transcurso restante del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles).

En una forma de realización, los procedimientos divulgados en el presente documento proporcionan la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo anti CD40 antagonista semanalmente (es decir, una vez a la semana) a lo largo de un periodo de tratamiento, o administrar esta dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista una vez cada tres semanas a lo largo de este periodo de tratamiento, en combinación con uno o más ciclos de un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles durante el transcurso de este periodo de tratamiento, en el que cada ciclo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles tiene una duración combinada de 4 semanas a 8 semanas, incluidas 4, 5, 6, 7 u 8 semanas. Por tanto, por ejemplo, cuando el anticuerpo anti CD40 antagonista se va a administrar una vez a la semana, una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti CD40 antagonista se administra el día 1 de cada semana del periodo de tratamiento y el primer ciclo de un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles de 4 semanas a 8 semanas se inicia comenzando el día, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 del mismo periodo de tratamiento.

En una forma de realización tal, las dosis terapéuticamente eficaces de la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista se administran semanalmente comenzando el día 1 de un periodo de tratamiento y continuando a lo largo del periodo de tratamiento, y un primer ciclo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles comienza el día 8 del mismo periodo de tratamiento y continua durante 8 semanas (es decir, durante las semanas 2-9 del periodo de tratamiento).

Como alternativa, los procedimientos divulgados en el presente documento contemplan regímenes de tratamiento para un sujeto que los necesite, en los que una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti CD40 antagonista se administra una vez a la semana o se administra una vez cada dos semanas, durante un tiempo fijo de 4 u 8 semanas, en combinación con un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles que tiene una duración combinada de aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 16 semanas, incluidas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16 semanas. En primer lugar se puede administrar cualquier agente, como se ha explicado en lo que antecede para este régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles. Por ejemplo, en una forma de realización, primero se administra una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo el día 1 de un periodo de tratamiento, seguida por el inicio del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles en un plazo de 10 días, preferentemente en un plazo de 7 días de la primera administración del anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo en un plazo de 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 días. Durante el régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles se administra una dosis semanal total mayor de IL-2 en el primer periodo de tiempo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles, por ejemplo durante las primeras 1-4 semanas de administración de IL-2 y dosis semanales totales menores de IL-2 se administran durante el segundo periodo de tiempo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles (es decir, durante el transcurso restante del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles).

En una forma de realización, los procedimientos divulgados en el presente documento proporcionan la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo anti CD40 antagonista semanalmente (es decir, una vez a la semana) o una vez cada dos semanas durante un tiempo fijo de 4 semanas u 8 semanas, en combinación con uno o más ciclos de un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles durante el transcurso de este periodo de tratamiento, en el que cada ciclo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles tiene una duración combinada de 4 semanas a 8 semanas, incluidas 4, 5, 6, 7 u 8 semanas. Por tanto, por ejemplo, cuando el anticuerpo anti CD40 antagonista se va a administrar una vez a la semana durante 4 semanas, una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti CD40 antagonista se administra el día 1 de las semanas 1-4 del periodo de tratamiento y el primer ciclo de un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles de 4 semanas a 8 semanas se inicia comenzando el día, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 del mismo periodo de tratamiento.

En una forma de realización tal, las dosis terapéuticamente eficaces de la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista se administran semanalmente durante un tiempo fijo de 4 semanas, comenzando el día 1 de un periodo de tratamiento, y un primer ciclo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles comienza el día 8 del mismo periodo de tratamiento y continua durante 8 semanas (es decir, durante las semanas 2-9 del periodo de tratamiento).

Interrupción de la dosificación de IL-2

Los procedimientos divulgados en el presente documento también contemplan formas de realización en las que se proporciona a un sujeto sometido a administración de anticuerpo anti CD40 antagonista de acuerdo con el programa de dosificación recomendado en el presente documento en combinación con la administración de uno o más ciclos de un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles un “descanso del fármaco” o un periodo sin dosificación de IL-2, o sin dosificación de IL-2 y dosificación de anticuerpo anti CD40 antagonista, entre la finalización del primer periodo de tiempo de cualquier ciclo dado del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles y el inicio del segundo periodo de tiempo de dicho ciclo concreto del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles. En estas formas de realización, el régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles se interrumpe de tal modo que la dosificación de IL-2 se suspende durante un periodo de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 4 semanas tras la finalización del primer periodo de tiempo de un ciclo dado del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles durante el cual se ha administrado la dosis semanal total mayor. Durante este periodo sin dosificación de IL-2, el sujeto puede continuar recibiendo una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista de acuerdo con el programa de dosificación recomendado en el presente documento (es decir, una vez a la semana, o una vez cada dos, tres o cuatro semanas) o, como alternativa, también se puede detener la dosificación del anticuerpo anti CD40 antagonista. La duración de esta interrupción de la dosificación de IL-2 dependerá de la salud del sujeto, la historia de progresión

de la enfermedad y la capacidad de respuesta del sujeto a la terapia inicial con IL-2/anticuerpo recibida durante el primer periodo de tiempo de cualquier ciclo dado del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles. En general, la dosificación de IL-2 se interrumpe durante un periodo de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 4 semanas, momento en el cual se administra al sujeto el segundo periodo de tiempo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles, en el que se administran las dosis semanales totales menores de IL-2 en combinación con la administración semanal de dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti CD40 antagonista. Con el fin de completar cualquier ciclo dado de un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles se administrará a un sujeto tanto el primer periodo de dosificación semanal total mayor como el segundo periodo de dosificación semanal total menor.

Durante este descanso de fármaco (es decir, periodo de tiempo sin administración de IL-2, o periodo de tiempo sin administración de IL-2 y anticuerpo anti CD40 antagonista), se controlan los recuentos de células asesinas naturales (NK) para determinar cuándo se debe continuar el régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles, o el régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles y la administración semanal del anticuerpo anti CD40 antagonista. Niveles de células NK superiores a 200 células/ μ l pueden ser un factor importante que influye sobre la respuesta clínica positiva a la terapia con anticuerpo anti CD40 antagonista. Por tanto, el control del recuento de células NK durante, al final, y después de cualquier ciclo dado de dosificación de IL-2 proporciona un medio para determinar si y cuándo se debe reinstaurar la terapia con IL-2 después de un tiempo sin dosificación de IL-2, que puede o no incluir un tiempo sin administración del anticuerpo anti CD40 antagonista.

De este modo, los recuentos de células NK se miden bisemanalmente o mensualmente durante el régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles y al final del primer periodo de tiempo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles antes de iniciar el descanso del fármaco. Cuando el recuento de células NK supera un nivel umbral aceptable, el régimen de dosificación de IL-2 se puede interrumpir. Por "nivel umbral aceptable" se entiende que el sujeto sometido a tratamiento tiene un recuento de células NK que es de aproximadamente 150 células/ μ l o mayor, preferentemente 200 células/ μ l o mayor. Después de la interrupción de la dosificación de IL-2, que puede o no incluir la interrupción de la administración del anticuerpo anti CD40 antagonista, los recuentos de células NK se miden una vez a la semana o dos veces a la semana después, o se pueden controlar con menor frecuencia, por ejemplo una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas. Un recuento de células NK que es menor al nivel umbral aceptable de aproximadamente 150 células/ μ l, por ejemplo un recuento de células NK inferior a 150 células/ μ l, es indicativo de la necesidad de continuar el régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles o el régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles y el régimen de dosificación del anticuerpo CD40 antagonista cuando el descanso de fármaco también incluye tiempo sin administración del anticuerpo CD40 antagonista. Preferentemente, el régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles se retoma cuando el recuento de células NK es inferior al nivel umbral de aproximadamente 200 células/ μ l, es decir un recuento de células NK inferior a 200 células/ μ l. En este momento se administra al sujeto el segundo periodo de tiempo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles, en el que se administran dosis semanales totales menores de IL-2 en combinación con el anticuerpo CD40 antagonista, en el que una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo se administra una vez a la semana o se administra una vez cada dos, tres o cuatro semanas.

En función de la salud general del sujeto, la respuesta clínica y la tolerabilidad de la terapia concurrente con estos dos agentes terapéuticos, tras la finalización de un primer ciclo de un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles, se puede administrar al sujeto uno o más ciclos posteriores de un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles en combinación con la administración de dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo CD40 antagonista, en la que una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo se administra una vez a la semana o se administra una vez cada dos, tres o cuatro semanas. En dichas formas de realización, el médico encargado del tratamiento puede permitir un descanso del fármaco o un periodo de tiempo sin administración de IL-2 entre ciclos sucesivos. Por tanto, tras la finalización de cualquier ciclo dado de un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles, que en sí mismo puede incluir o no un periodo de tiempo sin administración de IL-2 entre los periodos primero y segundo de dosificación de IL-2, se puede proporcionar al sujeto un descanso de la administración de IL-2 antes de iniciar un ciclo posterior del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles. En general, el periodo de tiempo sin administración de IL-2 entre cualquier ciclo dado de la dosificación de IL-2 de dos niveles es de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 4 semanas, incluidas aproximadamente 1, 2, 3 ó 4 semanas. Durante los descansos del fármaco IL-2, este periodo sin dosificación de IL-2, el sujeto puede continuar recibiendo dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti CD40 antagonista que se pueden administrar una vez a la semana, o una vez cada dos, tres o cuatro semanas, o, como alternativa, también se puede detener la dosificación del anticuerpo anti CD40 antagonista.

Cursos posteriores de terapia de combinación con IL-2/anticuerpo anti CD40 antagonista

Cuando un sujeto sometido a terapia de acuerdo con los regímenes de dosificación mencionados anteriormente exhibe una respuesta parcial, o una recaída tras un periodo prolongado de remisión, pueden ser necesarios ciclos adicionales de terapia concurrente para alcanzar la remisión completa de la enfermedad. Por tanto, después de un periodo de tiempo sin un primer periodo de tratamiento que puede haber comprendido un régimen de dosificación de IL-2 constante o un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles en combinación con una terapia con anticuerpo anti CD40 a lo largo del periodo de tratamiento o durante un tiempo fijo en el periodo de tratamiento, un sujeto puede recibir uno o más periodos de tratamiento adicionales que comprende cualquiera de los regímenes de dosificación de IL-2 constante o de dos niveles en combinación con la administración del anticuerpo anti CD40 antagonista, en la que el anticuerpo se puede administrar a lo largo del(los) periodo(s) de tratamiento adicionales o se puede administrar durante un tiempo fijo dentro del periodo de tratamiento. En el presente documento, tal periodo de tiempo entre periodos de tratamiento se denomina periodo de tiempo de interrupción. Se reconoce que la duración del periodo

de tiempo de interrupción depende del grado de respuesta tumoral (es decir, completa frente a parcial) obtenida con cualquier periodo de tratamiento previo de terapia concurrente con estos dos agentes terapéuticos.

Por tanto, por ejemplo, cuando un sujeto es sometido a terapia concurrente con dosis semanales del anticuerpo anti CD40 antagonista y un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles, que puede incluir o no un periodo de descanso del fármaco entre los periodos de tiempo primero y segundo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles, su régimen de tratamiento puede incluir múltiples sesiones de tratamiento, cada una de las cuales comprende terapia concurrente con dosis semanales del anticuerpo anti CD40 antagonista y un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles. En el presente documento, estas múltiples sesiones de tratamiento se denominan ciclos de mantenimiento, en el que cada ciclo de mantenimiento comprende la administración del anticuerpo anti CD40 antagonista en combinación con un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles completado. Por "régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles completado" se entiende que se ha administrado al sujeto tanto el primer periodo de dosificación semanal total mayor como el segundo periodo de dosificación semanal total menor. La necesidad de múltiples ciclos de mantenimiento se puede evaluar controlando el recuento de células NK de un modo similar al usado para determinar cuando se necesita un descanso del fármaco y cuándo debe concluir dicho descanso del fármaco. Por tanto, tras la finalización del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles en cualquier ciclo de mantenimiento dado, el médico encargado del tratamiento obtiene una medición del recuento de células NK. Después, este indicador se mide a intervalos mensuales (es decir, una vez al mes) tras la finalización de cualquier régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles. Como ocurre con los descansos del fármaco, un recuento de células NK inferior al nivel umbral aceptable (es decir, inferior a aproximadamente 150 células/ μ l, preferentemente inferior a aproximadamente 200 células/ μ l) es indicativo de la necesidad de administrar otro ciclo de mantenimiento al sujeto. La duración entre ciclos de mantenimiento puede ser de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 6 meses, incluido 2 mes, 1,5 meses, 2 meses, 2,5 meses, 3 meses, 3,5 meses, 4 meses, 4,5 meses, 5 meses, 5,5 meses, 6 meses, u otros periodos de tiempo tales que entran dentro del intervalo de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 6 meses.

Por tanto, los procedimientos de administración divulgados en el presente documento proporcionan un medio mejor para tratar cánceres que comprenden células que expresan CD40, por ejemplo cánceres relacionados con células B, tales como linfomas, mielomas y leucemia, y cánceres sólidos, tales como cáncer riñón (incluidos, por ejemplo, los carcinomas de células renales), de vejiga urinaria, de hígado (incluidos, por ejemplo, los carcinomas hepatocelulares), gástrico, cervical, de próstata, nasofaríngeo, tiroideo (por ejemplo, carcinoma papilar tiroideo) y de piel, tal como el melanoma, y sarcomas (incluidos, por ejemplo, osteosarcomas y sarcomas de Ewing). Sin quedar ligado a teoría alguna, el programa de dosificación de IL-2 constante con interrupciones proporciona un programa de dosificación intermitente que permite la administración menos frecuente de la IL-2 durante la terapia con anticuerpo anti CD40 antagonista y mejor tolerabilidad de la terapia con IL-2 a largo plazo. El régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles ofrece la oportunidad de proporcionar a un paciente dosis semanales totales mayores de IL-2, que proporcionan la expansión de la cifra de células NK que se pueden mantener con una dosis menor durante las semanas posteriores de dosificación de IL-2. Este protocolo de administración tiene la atracción adicional de proporcionar descansos del fármaco IL-2 entre los programas de dosificación de IL-2 semanal total mayor y menor, así como descansos del fármaco IL-2 entre los ciclos completados del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles, contribuyendo de nuevo a un incremento de la tolerabilidad de la terapia concurrente con el anticuerpo anti CD40 antagonista e IL-2.

Se reconoce que cuando un sujeto sometido a terapia de acuerdo con los regímenes de dosificación mencionados anteriormente exhibe una respuesta parcial, o una recaída tras un periodo prolongado de remisión, el sujeto podría recibir el anticuerpo anti CD40 antagonista como único agente terapéutico, o en combinación con otra oncoterapia. Por tanto, un sujeto que ha recibido terapia concurrente previa con IL-2 y anticuerpo anti CD40 antagonista para el tratamiento de un cáncer que comprende células neoplásicas que expresan CD40 y que necesita tratamiento adicional para el cáncer puede recibir terapia con un anticuerpo anti CD40 antagonista solo o un anticuerpo anti CD40 antagonista y al menos una oncoterapia previa a la, o como alternativa a la, terapia concurrente adicional con el anticuerpo anti CD40 antagonista e IL-2. Otros tipos de oncoterapia incluyen, entre otros, los descritos más adelante en el presente documento.

Programa de dosificación de IL-2

Para sujetos humanos sometidos a terapia concurrente con anticuerpo anti CD40 antagonista de acuerdo con el programa de administración recomendado en el presente documento en combinación con uno o más ciclos de un régimen de dosificación de IL-2 constante o uno o más ciclos de un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles, la dosis semanal total de IL-2 que se va a administrar durante los periodos de dosificación de IL-2 se puede administrar como una dosis única o puede repartirse en una serie de dosis equivalentes que se administran de acuerdo con un programa de dosificación de dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete veces a la semana. Cuando las dosis semanales totales mayores se deben administrar durante un primer periodo de tiempo y las dosis semanales totales menores se deben administrar durante un segundo periodo de tiempo, no es necesario que la dosis semanal total se administre del mismo modo durante los dos periodos de dosificación. Por tanto, por ejemplo, la dosis semanal total mayor durante el primer periodo de tiempo de un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles se puede administrar en forma de una dosis única o se puede repartir en una serie de dosis equivalentes que se administran de acuerdo con un régimen de dosificación de dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete veces a la semana. De forma similar, la dosis semanal total menor durante el segundo periodo de tiempo de un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles se puede administrar en forma de una dosis única o se puede repartir en una serie de dosis equivalentes que se administran de acuerdo con un régimen de dosificación de dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete veces a la semana.

ES 2 346 977 T3

Para los fines de la presente invención, un “programa de dosificación de dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete veces a la semana” se entiende que significa que la dosis semanal total se reparte en dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete dosis equivalentes, respectivamente, que se administran al sujeto durante el transcurso de un periodo de 7 días, no administrándose más de una dosis equivalente por periodo de 24 horas. La serie de dosis equivalentes se puede administrar en días secuenciales o se puede administrar de modo que pasen uno o más días entre dos dosis cualesquiera consecutivas, en función del número total de dosis equivalentes administradas a la semana.

Por tanto, por ejemplo, cuando una serie de dos dosis equivalentes de IL-2 se administra a la semana (es decir, durante un periodo de 7 días) y la primera dosis equivalente de dicha semana se administra el día 1, la segunda dosis equivalente de IL-2 se puede administrar el día 3, 4, 5, 6 ó 7 de esa semana. En una forma de realización, la dosis semanal total de IL-2 se reparte en dos dosis equivalentes que se administran al sujeto en un periodo de 7 días, lo que permite un mínimo de 72 horas entre dosis y un máximo de 96 horas entre dosis.

De forma similar, cuando una serie de tres dosis equivalentes de IL-2 se administra a la semana y la primera dosis equivalente de dicha semana se administra el día 1, la segunda dosis equivalente se puede administrar el día 2, 3, 4, 5 ó 6 de esa semana y la tercera dosis equivalente se puede administrar el día 3, 4, 5, 6 ó 7 de esa semana, siempre que transcurran aproximadamente 24 horas entre la administración de la segunda y la tercera dosis equivalente. En una forma de realización, la dosis semanal total de IL-2 se reparte en tres dosis equivalentes que se administran al sujeto en un periodo de 7 días, lo que permite un mínimo de 25 horas entre dosis y un máximo de 72 horas entre dosis.

Cuando una serie de cuatro dosis equivalentes de IL-2 se administra a la semana y la primera dosis equivalente de dicha semana se administra el día 1, la segunda dosis equivalente se puede administrar el día 2, 3, 4 ó 5 de esa semana y la tercera dosis equivalente se puede administrar el día 3, 4, 5 ó 6 de esa semana, y la cuarta dosis equivalente se puede administrar el día 4, 5, 6 ó 7 de esa semana, siempre que transcurran aproximadamente 24 horas entre la administración de cualquiera de las dos dosis consecutivas (es decir, entre la primera y la segunda dosis equivalentes, entre la segunda y la tercera dosis equivalentes y entre la tercera y la cuarta dosis equivalentes).

Cuando una serie de cinco dosis equivalentes de IL-2 se administra a la semana y la primera dosis equivalente de dicha semana se administra el día 1, la segunda dosis equivalente se puede administrar el día 2, 3 ó 4 de esa semana y la tercera dosis equivalente se puede administrar el día 3, 4 ó 5 de esa semana, la cuarta dosis equivalente se puede administrar el día 4, 5, 6 ó 7 de esa semana, y la quinta dosis equivalente se puede administrar el día 5, 6 ó 7 de esa semana siempre que transcurran aproximadamente 24 horas entre la administración de cualquiera de las dos dosis consecutivas (es decir, entre la primera y la segunda dosis equivalentes, entre la segunda y la tercera dosis equivalentes y entre la tercera y la cuarta dosis equivalentes y entre la cuarta y la quinta dosis equivalentes).

Cuando una serie de seis dosis equivalentes de IL-2 se administra a la semana y la primera dosis equivalente de dicha semana se administra el día 1, la segunda dosis equivalente se puede administrar el día 2 ó 3 de esa semana, la tercera dosis equivalente se puede administrar el día 3 ó 4 de esa semana, la cuarta dosis equivalente se puede administrar el día 4, 5 ó 6 de esa semana, la quinta dosis equivalente se puede administrar el día 5, 6 ó 7 de esa semana y la sexta dosis equivalente se puede administrar el día 6 ó 7 de esa semana, siempre que transcurran aproximadamente 24 horas entre la administración de cualquiera de las dos dosis consecutivas (es decir, entre la primera y la segunda dosis equivalentes, entre la segunda y la tercera dosis equivalentes y entre la tercera y la cuarta dosis equivalentes y entre la cuarta y la quinta dosis equivalentes y entre la quinta y la sexta dosis equivalentes).

En una forma de realización, la dosis semanal total de IL-2 se reparte en siete dosis equivalentes, que se administran a diario durante el periodo de 7 días, con aproximadamente 24 horas entre cada dosis consecutiva.

No es necesario seguir el mismo programa de dosificación a lo largo de un régimen de dosificación de IL-2 constante no seguir el mismo programa de dosificación para el primero y el segundo periodos del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles. Por tanto, el programa de dosificación se puede ajustar para acomodar la tolerancia de un individuo a la terapia IL-2 prolongada en combinación con la terapia con anticuerpo anti CD40 antagonista y para reflejar la capacidad de respuesta del individuo a la terapia concurrente con estos dos agentes terapéuticos. El médico encargado del tratamiento puede determinar con facilidad el programa de dosificación durante el régimen de dosificación de IL-2 constante y los dos periodos de tiempo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles según la historia médica del paciente y la orientación proporcionada en el presente documento.

Intervalos de dosis del anticuerpo anti CD40 antagonista para usar en la terapia de combinación con IL-2/anticuerpo anti CD40 antagonista

Para los fines de la presente invención, la dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno como se ha definido en otras partes del presente documento que se va a administrar en combinación con terapia con IL-2 como se ha divulgado en el presente documento varía desde aproximadamente 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg, desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 40 mg/kg, desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 0,5 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 25 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg, desde aproximadamente 5 mg/kg hasta aproximadamente 15 mg/kg, o desde aproximadamente 7 mg/kg

hasta aproximadamente 12 mg/kg. Por consiguiente, por ejemplo, la dosis de cualquier anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno, por ejemplo el anticuerpo monoclonal anti-CD40 CHIR-12.12 o CHIR-5.9 o su fragmento de unión al antígeno, puede ser de 0,003 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, u otra dosis semejante que esté dentro el intervalo desde aproximadamente 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg. La misma dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno puede administrarse a lo largo de cada semana de dosificación del anticuerpo. Como alternativa, pueden usarse diferentes dosis terapéuticamente eficaces de un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno durante el transcurso de un período de tratamiento.

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

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

En algunas formas de realización de la invención, la terapia con anticuerpo anti CD40 antagonista se inicia administrando una “dosis de carga” del anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno al sujeto que necesita terapia con de combinación con IL-2/anticuerpo anti CD40 antagonista. Por “dosis de carga” se entiende una dosis inicial del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno que se administra al sujeto, en la que la dosis del anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno administrado está dentro del intervalo de dosificación superior (es decir, desde aproximadamente 20 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg). La “dosis de carga” puede administrarse como una única administración, por ejemplo, una infusión única en la que el anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno se administra por vía IV, o como administraciones múltiples, por ejemplo, infusiones múltiples en las que el anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno se administra por vía IV, siempre que la “dosis de carga” completa se administre en un período de aproximadamente 24 horas. Tras la administración de la “dosis de carga”, se administra a continuación al sujeto una o más dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno al sujeto. Pueden administrarse dosis terapéuticamente eficaces posteriores, por ejemplo, según un programa de dosificación semanal, o una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, o una vez cada cuatro semanas, como se ha indicado en lo que antecede en el presente documento. En tales formas de realización, las dosis terapéuticamente eficaces posteriores generalmente están en el intervalo de dosificación inferior (es decir, desde 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg). Como alternativa, en algunas formas de realización, tras la “dosis de carga”, las posteriores dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno se administran según un “programa de mantenimiento”, en el que la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno se administra una vez al mes, una vez cada 6 semanas, una vez cada dos meses, una vez cada 10 semanas, una vez cada tres meses, una vez cada 14 semanas, una vez cada cuatro meses, una vez cada 18 semanas, una vez cada cinco meses, una vez cada 22 semanas, una vez cada seis meses, una vez cada 7 meses, una vez cada 8 meses, una vez cada 9 meses, una vez cada 10 meses, una vez cada 11 meses, o una vez cada 12 meses. En tales formas de realización, la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno está en el intervalo de dosificación inferior (es decir, desde 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg), en particular cuando las dosis posteriores se administran en intervalos más frecuentes, por ejemplo, una vez cada dos semanas hasta una vez al mes, o dentro del intervalo de dosificación superior (es decir, desde aproximadamente 20 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg), en particular cuando las dosis posteriores se administran en intervalos menos frecuentes, por ejemplo, cuando las dosis posteriores se administran separadas por aproximadamente un mes hasta aproximadamente 12 meses.

Intervalos de dosis de IL-2 para usar en la terapia de combinación con IL-2/Anticuerpo anti CD40 antagonista

Para los fines de la siguiente discusión de dosis terapéuticamente eficaces de IL-2 o una variante biológicamente activa de la misma que se va a administrar en combinación con terapia con anticuerpo anti CD40 antagonista, la composición farmacéutica de IL-2 disponible comercialmente con la marca Proleukin® (Chiron Corporation, Emeryville, California) se usa como la IL-2 de referencia convencional. Por “IL-2 de referencia convencional” se entiende la formulación de IL-2 que sirve como base para la determinación de las dosis terapéuticamente eficaces de IL-2, o una variante biológicamente activa de la misma, que se va a administrar a un sujeto humano con un cáncer que comprende células que expresan CD40 en combinación con la terapia con anticuerpo anti CD40 antagonista. El resto activo usado en este producto de IL-2 es la muteína de IL-2 humana recombinante aldesleukina (denominada interleucina-2 humana des-alanil-1, serina-125; véase la patente de EE.UU. n° 4.931.543).

Por tanto, por ejemplo, cuando la fuente de la IL-2 es Proleukin[®], la dosis semanal total de Proleukin[®] IL-2 que se va a administrar en combinación con la terapia con anticuerpo anti CD40 antagonista está en el intervalo de aproximadamente 18 millones de unidades internacionales (MUI) a aproximadamente 54 MUI, en función de la historia médica del paciente que va a recibir la terapia y el régimen de dosificación de IL-2 recomendado (por ejemplo, régimen de dosificación de IL-2 constante frente a de dos niveles). Cuando se van a administrar dosis mayores de IL-2, la dosis semanal total de Proleukin[®] IL-2 puede estar en el intervalo de aproximadamente 42,0 MUI a aproximadamente 54,0 MUI, incluidas aproximadamente 42,0 MUI, 43,5 MUI, 45,0 MUI, 46,5 MUI, 48,0 MUI, 49,5 MUI, 51,0 MUI, 52,5 MUI y 54,0, y otros de estos valores que entran dentro de este intervalo. Cuando se van a administrar dosis intermedias de IL-2, la dosis semanal total de Proleukin[®] IL-2 puede estar en el intervalo de aproximadamente 30,0 MUI a aproximadamente 42,0 MUI, incluidas aproximadamente 30,0 MUI, 31,5 MUI, 33,0 MUI, 34,5 MUI, 36,0 MUI, 37,5 MUI, 39,0 MUI, 40,5 MUI y 42,0, y otros de estos valores que entran dentro de este intervalo. Cuando se van a administrar dosis menores de IL-2, la dosis semanal total de Proleukin[®] IL-2 puede estar en el intervalo de aproximadamente 18,0 MUI a aproximadamente 30,0 MUI, incluidas aproximadamente 18,0 MUI, 19,5 MUI, 21,0 MUI, 22,5 MUI, 24,0 MUI, 25,5 MUI, 27,0 MUI, 28,5 MUI y 30,0, y otros de estos valores que entran dentro de este intervalo.

Dosis recomendadas para el régimen de dosificación de IL-2 constante

Cuando Proleukin[®] IL-2 se va a administrar de acuerdo con un régimen de dosificación de IL-2 constante en combinación con la terapia con anticuerpo anti CD40 antagonista, la dosis semanal total de esta IL-2 de referencia convencional es de aproximadamente 18,0 MUI a aproximadamente 54,0 MUI. Por tanto, por ejemplo, en algunas formas de realización, la cantidad de Proleukin[®] IL-2 que se va a administrar a la semana como parte de un régimen de dosificación de IL-2 constante es aproximadamente 18,0 MUI, 20 MUI, 22,0 MUI, 24,0 MUI, 26,0 MUI, 28,0 MUI, 30,0 MUI, 32,0 MUI, 34,0 MUI, 36,0 MUI, 38,0 MUI, 40,0 MUI, 42,0 MUI, 44,0 MUI, 46,0 MUI, 48,0 MUI, 50,0 MUI, 52,0 MUI o 54,0 MUI, y otras dosis similares que entran dentro del intervalo de aproximadamente 18,0 MUI a aproximadamente 54,0 MUI. En alguna forma de realización, la dosis semanal total de Proleukin[®] IL-2 entra dentro del intervalo de aproximadamente 42,0 MUI a aproximadamente 54,0 MUI, por ejemplo, 42,0 MUI, 44,0 MUI, 46,0 MUI, 48,0 MUI, 50,0 MUI, 52,0 MUI o 54,0 MUI. En otras formas de realización, la dosis semanal total de Proleukin[®] IL-2 entra dentro del intervalo de aproximadamente 30,0 MUI a aproximadamente 42,0 MUI, por ejemplo aproximadamente 30,0 MUI, 32,0 MUI, 34,0 MUI, 36,0 MUI, 38,0 MUI, 40,0 MUI o 42,0 MUI. En formas de realización alternativas, la dosis semanal total de Proleukin[®] IL-2 es aproximadamente 18,0 MUI a aproximadamente 30,0 MUI, por ejemplo, 18,0 MUI, 20 MUI, 22,0 MUI, 24,0 MUI, 26,0 MUI, 28,0 MUI o 30,0 MUI.

Como se ha indicado anteriormente, la dosis semanal total de IL-2 durante un régimen de dosificación de IL-2 constante se puede administrar en forma de una dosis única o se puede repartir en una serie de dosis equivalentes que se administran de acuerdo con un régimen de dosificación de dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete veces a la semana. Por tanto, por ejemplo, cuando la dosis semanal total de Proleukin[®] IL-2 es 54,0 MUI, las tres dosis equivalentes de esta fuente de IL-2 que se va a administrar durante cada semana sería 18,0 MUI y las dos dosis equivalentes de esta fuente de IL-2 que se va a administrar durante cada semana sería 27,0 MUI. De forma similar, cuando la dosis semanal total de Proleukin[®] IL-2 es 42,0 MUI, las tres dosis equivalentes de esta fuente de IL-2 que se va a administrar durante cada semana sería 14,0 MUI y las dos dosis equivalentes de esta fuente de IL-2 que se va a administrar durante cada semana sería 21,0 MUI. Cuando la dosis semanal total de Proleukin[®] IL-2 es 30,0 MUI, las tres dosis equivalentes de esta fuente de IL-2 que se va a administrar durante cada semana de dosificación de IL-2 sería 10,0 MUI y las dos dosis equivalentes de esta fuente de IL-2 que se va a administrar durante cada semana de dosificación de IL-2 sería 15 MUI. De forma similar, cuando la dosis semanal total de Proleukin[®] IL-2 es 18,0 MUI, las tres dosis equivalentes de esta fuente de IL-2 que se va a administrar durante cada semana sería 6,0 MUI y las dos dosis equivalentes de esta fuente de IL-2 que se va a administrar durante cada semana sería 9,0 MUI.

De acuerdo con los procedimientos divulgados en el presente documento, al sujeto se administra este régimen de dosificación de IL-2 constante en combinación con dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti CD40 antagonista, o su fragmento de unión a antígeno, en el que la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo o de su fragmento de unión a antígeno se administra de acuerdo con un régimen de dosificación divulgado en el presente documento (es decir, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas a lo largo de un periodo de tratamiento o para una duración fija dentro de un periodo de tratamiento). La dosis terapéuticamente eficaz de anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión a antígeno que se va a administrar está en el intervalo de aproximadamente 0,003 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, incluidas de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg. Por tanto, por ejemplo, en algunas formas de realización, la cantidad total del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión a antígeno es de aproximadamente 0,003 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, u otras dosis semejantes que estén dentro el intervalo desde aproximadamente 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg.

Por tanto, por ejemplo, en algunas formas de realización, la cantidad total de Proleukin[®] IL-2 que se va a administrar a la semana como parte de un régimen de dosificación de IL-2 constante es aproximadamente 42,0 MUI, 44,0 MUI, 46,0 MUI, 48,0 MUI, 50,0 MUI, 52,0 MUI ó 54,0 MUI, y la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión a antígeno que se va a administrar en combinación con el régimen de dosificación de IL-2 constante es de aproximadamente 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg ó 50

mg/kg, en las que esta dosis del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión a antígeno se administra una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas, a lo largo de un periodo de tratamiento o para una duración fija dentro de un periodo de tratamiento. En una de estas formas de realización, la cantidad total de Proleukin® IL-2 que se va a administrar a la semana como parte de un régimen de dosificación de IL-2 constante es aproximadamente 42,0 MUI y la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión a antígeno que se va a administrar en combinación con el régimen de dosificación de IL-2 constante es de aproximadamente 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg ó 35 mg/kg, en las que esta dosis del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión a antígeno se administra una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas, a lo largo de un periodo de tratamiento o para una duración fija dentro de un periodo de tratamiento. En formas de realización preferidas, esta dosis semanal total de 42,0 MUI de Proleukin® IL-2 se reparte en dos o tres dosis equivalentes que se administran de acuerdo con un programa de dosificación de dos o tres veces a la semana, respectivamente. De esta manera, las dos dosis equivalentes de esta fuente de IL-2 que se va a administrar durante cada semana del régimen de dosificación de IL-2 constante sería 21,0 MUI y las tres dosis equivalentes de esta fuente de IL-2 que se va a administrar durante cada semana del régimen de dosificación de IL-2 constante sería 14,0 MUI.

En otras formas de realización, la cantidad total de Proleukin® IL-2 que se va a administrar a la semana como parte de un régimen de dosificación de IL-2 constante es aproximadamente 30,0 MUI, 32,0 MUI, 34,0 MUI, 36,0 MUI, 38,0 MUI, 40,0 MUI ó 42,0 MUI, y la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión a antígeno que se va a administrar en combinación con el régimen de dosificación de IL-2 constante es de aproximadamente 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg ó 50 mg/kg, en las que esta dosis del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión a antígeno se administra una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas, a lo largo de un periodo de tratamiento o para una duración fija dentro de un periodo de tratamiento. En una de estas formas de realización, la cantidad total de Proleukin® IL-2 que se va a administrar a la semana como parte de un régimen de dosificación de IL-2 constante es aproximadamente 30,0 MUI y la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión a antígeno que se va a administrar en combinación con el régimen de dosificación de IL-2 constante es de aproximadamente 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, o 35 mg/kg, en las que esta dosis del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión a antígeno se administra una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas, a lo largo de un periodo de tratamiento o para una duración fija dentro de un periodo de tratamiento. En formas de realización preferidas, esta dosis semanal total de 30,0 MUI de Proleukin® IL-2 se reparte en dos o tres dosis equivalentes que se administran de acuerdo con un programa de dosificación de dos o tres veces a la semana, respectivamente. De esta manera, las dos dosis equivalentes de esta fuente de IL-2 que se va a administrar durante cada semana del régimen de dosificación de IL-2 constante sería 15,0 MUI y las tres dosis equivalentes de esta fuente de IL-2 que se va a administrar durante cada semana del régimen de dosificación de IL-2 constante sería 10,0 MUI.

En otras formas de realización más, la cantidad total de Proleukin® IL-2 que se va a administrar a la semana como parte de un régimen de dosificación de IL-2 constante es aproximadamente 18,0 MUI, 20 MUI, 22,0 MUI, 24,0 MUI, 26,0 MUI, 28,0 MUI ó 30,0 MUI, y la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión a antígeno que se va a administrar en combinación con el régimen de dosificación de IL-2 constante es de aproximadamente 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 35 mg/kg ó 50 mg/kg, en las que esta dosis del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión a antígeno se administra una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas, a lo largo de un periodo de tratamiento o para una duración fija dentro de un periodo de tratamiento. En una de estas formas de realización, la cantidad total de Proleukin® IL-2 que se va a administrar a la semana como parte de un régimen de dosificación de IL-2 constante es aproximadamente 18,0 MUI y la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión a antígeno que se va a administrar en combinación con el régimen de dosificación de IL-2 constante es de aproximadamente 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg ó 35 mg/kg, en las que esta dosis del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión a antígeno se administra una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas, a lo largo de un periodo de tratamiento o para una duración fija dentro de un periodo de tratamiento. En formas de realización preferidas, esta dosis semanal total de 18,0 MUI de Proleukin® IL-2 se reparte en dos o tres dosis equivalentes que se administran de acuerdo con un programa de dosificación de dos o tres veces a la semana, respectivamente. De esta manera, las dos dosis equivalentes de esta fuente de IL-2 que se va a administrar durante cada semana del régimen de dosificación de IL-2 constante sería 9,0 MUI y las tres dosis equivalentes de esta fuente de IL-2 que se va a administrar durante cada semana del régimen de dosificación de IL-2 constante sería 6,0 MUI.

Dosis recomendadas para el régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles

Cuando Proleukin® IL-2 se va a administrar de acuerdo con un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles en combinación con la terapia con anticuerpo anti CD40 antagonista, la dosis semanal total mayor de esta IL-2 de referencia convencional que se administra durante el primer periodo de tiempo de este régimen de dosificación de IL-2 es de aproximadamente 30,0 MUI a aproximadamente 54,0 MUI y la dosis semanal total menor que se administra durante el segundo periodo de tiempo de este régimen de dosificación de IL-2 es de aproximadamente 18,0 MUI a aproximadamente 39,0 MUI. Como se ha indicado anteriormente, la dosis semanal total administrada durante el primer periodo

de tiempo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles, por ejemplo durante la primera mitad de este régimen de dosificación, siempre es mayor que la dosis semanal total administrada durante el segundo periodo de tiempo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles, por ejemplo durante la segunda mitad de este régimen de dosificación.

5 Por tanto, en algunas formas de realización, la dosis semanal total mayor de Proleukin® IL-2 que se administra durante el primer periodo de tiempo de este régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles es de aproximadamente 30,0 MUI a aproximadamente 54,0 MUI, incluidas aproximadamente 30,0 MUI, 32,0 MUI, 35,0 MUI, 37,0 MUI, 40,0 MUI, 42,0 MUI, 45,0 MUI, 47,0 MUI, 50,0 MUI, 52,0 MUI ó 54,0 MUI, y otros valores similares que entran dentro de este intervalo de dosificación mayor; y la dosis semanal total menor de Proleukin® IL-2 es de aproximadamente 18,0 MUI a aproximadamente 39,0 MUI, incluidas 18,0 MUI, 20,0 MUI, 23,0 MUI, 25,0 MUI, 27,0 MUI, 30,0 MUI, 32 MUI, 35,0 MUI, 37,0 MUI ó 39,0 MUI, y otros valores similares que entran dentro de este intervalo de dosificación menor.

15 Como se ha indicado anteriormente, la dosis semanal total de IL-2 durante el primero y el segundo periodos de tiempo de un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles se administra en forma de una dosis única o se reparte en una serie de dosis equivalentes que se administran de acuerdo con un régimen de dosificación de dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete veces a la semana. Por tanto, por ejemplo, cuando la dosis semanal total de Proleukin® IL-2 durante el primer periodo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles es 42,0 MUI, las tres dosis equivalentes de IL-2 de referencia convencional que se va a administrar durante cada semana sería 14,0 MUI y las dos dosis equivalentes de esta IL-2 de referencia convencional que se va a administrar durante cada semana sería 21,0 MUI. De forma similar, cuando la dosis semanal total de Proleukin® IL-2 durante el segundo periodo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles es 30,0 MUI, las tres dosis equivalentes de IL-2 de referencia convencional que se va a administrar durante cada semana sería 10,0 MUI y las dos dosis equivalentes de esta IL-2 de referencia convencional que se va a administrar durante cada semana sería 15,0 MUI.

25 De acuerdo con los procedimientos divulgados en el presente documento, al sujeto se administra este régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles en combinación con dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti CD40 antagonista, o su fragmento de unión a antígeno, en el que la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo o de su fragmento de unión a antígeno se administra una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas a lo largo de un periodo de tratamiento o para una duración fija dentro de un periodo de tratamiento. La dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti CD40, o de su fragmento de unión a antígeno, que se va a administrar está en el intervalo desde aproximadamente 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg, incluido de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg. Por tanto, por ejemplo, en algunas formas de realización, la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40, o de su fragmento de unión a antígeno, es de aproximadamente 0,003 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, u otras dosis que entran dentro del intervalo de aproximadamente 0,003 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg.

40 En una forma de realización, las dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti CD40 antagonista, o su fragmento de unión a antígeno, como se ha indicado en lo que antecede, se administran una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas a lo largo de un periodo de tratamiento o para una duración fija dentro de un periodo de tratamiento, y el régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles que se debe administrar en combinación con este régimen de dosificación del anticuerpo anti CD40 antagonista tiene una duración combinada de 4 semanas a 8 semanas, en la que la dosis semanal total mayor de Proleukin® IL-2 que se administra durante el primer periodo de tiempo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles es de aproximadamente 30,0 MUI a aproximadamente 54,0 MUI, tal como 30,0 MUI, 32,0 MUI, 34,0 MUI, 36,0 MUI, 38,0 MUI, 40,0 MUI, 42,0 MUI, 45,0 MUI, 47,0 MUI, 50,0 MUI, 52,0 MUI, o 54,0 MUI, y la dosis semanal total menor de Proleukin® IL-2 que se administra durante el segundo periodo de tiempo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles es de aproximadamente 18,0 MUI a aproximadamente 39,0 MUI, tales como 18,0, 20,0, 22,0, 24,0, 26,0, 28,0, 30,0 MUI, 32,0 MUI, 35,0 MUI, 37,0 MUI, o 39,0 MUI. En una forma de realización tal, la dosis semanal total mayor de Proleukin® IL-2 que se administra durante el primer periodo de tiempo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles es 42,0 MUI y la dosis semanal total menor de Proleukin® IL-2 que se administra durante el segundo periodo de tiempo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles es 30,0 MUI.

55 Por tanto, por ejemplo, en algunas formas de realización, el sujeto se somete a terapia concurrente con administración semanal del anticuerpo anti CD40 antagonista, o su fragmento de unión a antígeno, y un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles que tiene una duración combinada de 8 semanas. Para esta forma de realización concreta, la dosificación de IL-2 comienza el día 1 de la semana 2 (es decir, el día 8 tras la primera dosificación con el anticuerpo anti CD40 antagonista, o su fragmento de unión a antígeno, el día 1 de este periodo de tratamiento. De este modo, la dosis semanal total de Proleukin® IL-2 que se va a administrar durante las semanas 2-5 del periodo de tratamiento está en el intervalo de aproximadamente 30,0 MUI a aproximadamente 54,0 MUI, tal como 30,0 MUI, 32,0 MUI, 35,0 MUI, 37,0 MUI, 40,0 MUI, 42,0 MUI, 45,0 MUI, 47,0 MUI, 50,0 MUI, 52,0 MUI, o 54,0 MUI, u otros valores tales que entran dentro de este intervalo de dosis mayor. En esta forma de realización, la dosis semanal total de Proleukin® IL-2 que se va a administrar durante las semanas 6-9 del periodo de tratamiento está en el intervalo de aproximadamente 18,0 MUI a aproximadamente 39,0 MUI, tales como 18,0, 20,0, 22,0, 24,0, 26,0, 28,0, 30,0 MUI, 32,0 MUI, 35,0 MUI, 37,0 MUI, o 39,0 MUI, u otros valores tales que entran dentro de este intervalo. Como se ha indicado previamente, la dosis semanal total que se va a administrar durante el primero y el segundo periodo del régimen de

dosificación de IL-2 de dos niveles se escoge de entre estos intervalos de modo que una dosis semanal total mayor se administra durante el primer periodo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles (por ejemplo, las semanas 2-5 de un periodo de tratamiento de 9 semanas) y una dosis semanal total menor se administra durante el segundo periodo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles (por ejemplo, las semanas 6-9 del mismo periodo de tratamiento de 9 semanas). Por tanto, por ejemplo, cuando la dosis semanal total de IL-2 durante el primer periodo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles es de aproximadamente 42,0 MUI a aproximadamente 54,0 MUI, la dosis semanal total de Proleukin® IL-2 durante el segundo periodo de la dosificación de IL-2 entra, preferentemente, dentro del intervalo de aproximadamente 18,0 MUI a aproximadamente 39,0 MUI.

Por tanto, cuando la duración de un periodo de tratamiento con la terapia concurrente con dosificación semanal del anticuerpo anti CD40 antagonista y con un del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles es de aproximadamente 9 semanas, en una forma de realización la dosis semanal total de Proleukin® IL-2 durante las semanas 2-5 del periodo de tratamiento es de aproximadamente 30,0 MUI a aproximadamente 54,0 MUI o de aproximadamente 30,0 MUI a aproximadamente 42,0 MUI, y la dosis semanal total de Proleukin® IL-2 durante las semanas 6-9 del periodo de tratamiento es de aproximadamente 18,0 MUI a aproximadamente 30,0 MUI.

En una forma de realización la dosis semanal total de Proleukin® IL-2 durante las semanas 2-5 es de aproximadamente 42,0 MUI, y dosis semanal total de Proleukin® IL-2 durante las semanas 6-9 es de aproximadamente 30,0 MUI. En esta forma de realización, cada una de las dosis semanales totales mayor y menor de Proleukin® IL-2 se reparte en dos dosis equivalentes que se administran de acuerdo con un régimen de dosificación de dos veces a la semana, en el que las dos dosis equivalentes se administran al sujeto dentro de un periodo de 7 días, permitiendo un mínimo de 72 horas entre dosis y un máximo de 96 horas entre dosis. En una forma de realización alternativa, cada una de las dosis semanales totales mayor y menor de Proleukin® IL-2 se reparte en tres dosis equivalentes que se administran de acuerdo con un régimen de dosificación de tres veces a la semana, en el que las tres dosis equivalentes se administran al sujeto dentro de un periodo de 7 días, permitiendo un mínimo de 25 horas entre dosis y un máximo de 72 horas entre dosis. Como se ha indicado en lo que antecede, la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión a antígeno que se va a administrar en combinación con el régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles es de aproximadamente 0,003 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, u otras de tales dosis que entran dentro del intervalo de aproximadamente 0,003 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, cuando esta dosis del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión a antígeno se administra semanalmente, bien a lo largo del periodo de tratamiento o para una duración fija de 4 semanas a 8 semanas dentro del periodo de tratamiento. En una forma de realización alternativa, esta dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión a antígeno se administra una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas, a lo largo del periodo de tratamiento, o se administra una vez cada dos semanas para una duración fija de 4 semanas a 8 semanas dentro del periodo de tratamiento, en el que también se administra al sujeto el régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles descrito en lo que antecede.

Dosis relativa frente a absoluta para la dosificación de IL-2

Las dosis semanales totales anteriores de Proleukin® IL-2 se expresan en términos de MUI, que representan las cantidades totales o las dosis absolutas que se van a administrar a un sujeto humano semanalmente. La dosis semanal total relativa correspondiente de Proleukin® IL-2 que se va a administrar a una persona se puede calcular con facilidad. La persona media tiene un área de superficie corporal de aproximadamente 1,7 m². Por tanto, cuando la dosis semanal total absoluta de Proleukin® IL-2 que se va a administrar es de aproximadamente 42,0 MUI a aproximadamente 54,0 MUI, la dosis semanal total relativa correspondiente de Proleukin® IL-2 es de aproximadamente 24,7 MUI/m² a aproximadamente 31,8 MUI/m². De forma similar, cuando la dosis semanal total absoluta es de aproximadamente 30,0 MUI a aproximadamente 42,0 MUI, la dosis semanal total relativa correspondiente es de aproximadamente 17,6 MUI/m² a aproximadamente 24,7 MUI/m². Cuando la dosis semanal total absoluta es de aproximadamente 18,0 MUI a aproximadamente 30,0 MUI, la dosis semanal total relativa correspondiente es de aproximadamente 10,6 MUI/m² a aproximadamente 17,6 MUI/m².

La unidad internacional (UI) para la actividad biológica la estableció en 1988 la Organización Mundial de la Salud (OMS) en International Laboratory for Biological Standards. Los materiales de referencia biológica de IL-2 proporcionados por el National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), que pertenece a la OMS, tienen 100 unidades internacionales por ampolla de IL-2 humana nativa derivada de células Jurkat. La actividad de un producto de IL-2 se puede medir contra este patrón internacional en un ensayo de potencia *in vitro* mediante proliferación de células HT-2. Por tanto, por ejemplo, la Proleukin® IL-2 tiene una actividad biológica de aproximadamente 16,36 MUI por mg de este producto de IL-2 según se determina mediante el ensayo de proliferación de células HT-2 (véase, por ejemplo, Gearing y Thorpe (1988) J. Immunological Methods 114:3-9; Nakanishi y col. (1984) J. Exp. Med. 160(6): 1605-1621). El resto activo usado en este producto es la muteína de IL-2 humana recombinante aldesleukina (denominada interleucina-2 humana des-alanil-1, serina-125; véase la patente de EE.UU. n° 4.931.543). Usando esta información se puede calcular la dosis absoluta terapéuticamente eficaz recomendada de Proleukin® IL-2 en microgramos.

Por tanto, cuando la dosis semanal total absoluta de Proleukin® IL-2 es de aproximadamente 18,0 MUI a aproximadamente 54,0 MUI, la dosis semanal total absoluta correspondiente de Proleukin® IL 2 en microgramos es de 1100 µg a aproximadamente 3300 µg de este producto. De forma similar, cuando la dosis semanal total absoluta en MUI

es de aproximadamente 18,0 MUI a aproximadamente 30,0 MUI, la dosis semanal total absoluta correspondiente de Proleukin® IL-2 en μg es de aproximadamente 1100 μg a aproximadamente 1834 μg . Cuando la dosis semanal total absoluta de Proleukin® IL-2 en MUI es de aproximadamente 30,0 MUI a aproximadamente 42,0 MUI, la dosis semanal total absoluta correspondiente en μg es de aproximadamente 1833 μg a aproximadamente 2567 μg . Por tanto, dada una semanal total absoluta correspondiente de Proleukin® IL-2 expresada en MUI, un experto en la técnica puede computar la dosis semanal total absoluta correspondiente expresada en μg de este producto de IL-2 concreto.

Cálculo de dosis de IL-2 para diferentes formulaciones de aldesleukina

Para los fines de describir esta invención, las dosis se IL-2 se han presentado usando Proleukin® IL-2 como la IL-2 de referencia convencional. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente que las dosis correspondientes serían para diferentes formulaciones de aldesleukina y vías de administración usando un factor de conversión basado en datos farmacocinéticos (PK) comparativos y la curva de tiempo-concentración sérica (AUC) para los datos PK recogidos durante un periodo de 24 horas para Proleukin® IL-2. Usando los datos PK, se determinó la exposición a IL-2 en sujetos humanos a los que se administró una dosis única de la IL-2 de referencia convencional. Estos sujetos se seleccionaron de modo que no habían recibido terapia IL-2 exógena previa (es decir, estos sujetos no habían recibido antes IL-2). Por “terapia IL-2 exógena” se entiende cualquier intervención mediante la cual un sujeto ha estado expuesto a una fuente exógena de IL-2, en oposición a la exposición que se produce con la producción del cuerpo de IL-2 natura. Algunos de estos sujetos habían recibido una dosis única de 4,5 MUI de la IL-2 de referencia convencional, mientras que otros habían recibido una dosis única de 7,5 o 18,0 MUI de la IL-2 de referencia convencional.

Tras la administración de la dosis única de la IL-2 de referencia convencional, la exposición de IL-2 en el suero sanguíneo se monitorizó durante las primeras 10 a 12 horas después de la inyección, después se extrapoló a 24 horas, y se calculó el área bajo la curva concentración sérica-tiempo (AUC) resultante para los datos recogidos durante ese periodo de 24 horas. Esta área bajo la curva concentración sérica-tiempo se denomina en el presente documento AUC_{0-24} . Los procedimientos para medir la exposición de IL-2 de este modo son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo Gustavson (1998) J Biol. Response Modifiers 1998:440-449; 5 Thompson y col. (1987) Cancer Research 47:4202-4207; Kirchner y col. (1998) Br. J. Clin. Pharmacol. 46:5-10; Piscitelli y col. (1996) Pharmacotherapy 16 (5):754-759; y el ejemplo 8 más adelante. Por tanto, para los sujetos que reciben una dosis de 4,5 MUI (275 μg) de Proleukin® IL-2, el valor de la AUC_{0-24} fue 51 UI*h/ml (SD= 14); para los sujetos que reciben una dosis de 7,5 MUI (458 μg) de Proleukin® IL-2, el valor de la AUC_{0-24} fue 79 UI*h/ml (SD= 29); y para los sujetos que reciben una dosis de 18 MUI (1100 μg) de Proleukin® IL-2, el valor de la AUC_{0-24} fue 344 UI*h/ml (SD= 127). Cuando estos datos de la AUC_{0-24} se determinan para la IL-2 de referencia convencional, Proleukin® IL-2, las dosis terapéuticamente eficaces descritas en el presente documento tienen como resultado una exposición a IL-2 dentro de un intervalo de aproximadamente 23 UI*h/ml de suero a aproximadamente 598 UI*h/ml de suero (véase el Ejemplo 8 más adelante).

La suma de las AUC_{0-24} individuales de dosis individuales comprenderá la AUC_{0-24} semanal total en dosis individuales repartidas. Por ejemplo, si una dosis de 18 MUI se administra tres veces a la semana, la AUC_{0-24} individual se estima a 344 UI*h/ml y la AUC_{0-24} semanal total será de 1032 UI*h/ml sobre la base de la suposición lineal de incremento de la AUC_{0-24} con la dosis tal como se muestra en la Tabla 1 que figura a continuación.

TABLA 1

Valores de AUC_{0-24} obtenidos tras la administración de Proleukin® IL-2

Dosis de Proleukin® IL-2 (MUI/ μG)	AUC_{0-24} (UI*h/ml)
18/1100	344
30/1834	574
42/2567	803
54/3300	1032

Asimismo, también se pudo obtener la misma AUC_{0-24} semanal total de 1032 UI*h/ml mediante administración de la dosis dos veces a la semana a 27 MUI o administración de la dosis cinco veces a la semana a aproximadamente 11 MUI.

Para cualquier otra formulación de aldesleukina, se puede determinar una dosis recomendada comparable para usar en los procedimientos descritos en el presente documento sobre la base de estos datos de AUC_{0-24} semanal para Proleukin® IL-2. De este modo, una dosis única de la formulación de aldesleukina de interés se administra a un sujeto humano y el nivel de IL-2 en el suero tras esta exposición inicial de IL-2 se determina recogiendo los datos PK y generando una AUC_{0-24} para la formulación de aldesleukina de interés. Por “exposición inicial a IL-2” se entiende que el sujeto utilizado para medir la exposición a IL-2 no ha recibido terapia previa con una fuente exógena de IL-2 como

se ha indicado en lo que antecede. A continuación, esta AUC_{0-24} se compara con la AUC_{0-24} para Proleukin® IL-2 para determinar un factor de conversión que se puede usar para calcular una dosis de la formulación de aldesleukina de interés que es comparable a la dosis recomendada para Proleukin® IL-2. Véanse, por ejemplo, los cálculos para una formulación representativa de IL-2 monomérica, L2-7001, que se muestran en el ejemplo 8 más adelante. Por tanto, para cualquier otra formulación de aldesleukina usada en los procedimientos descritos en el presente documento, la dosis semanal total de IL-2 que se va a administrar durante un régimen de dosificación constante de IL-2, o durante un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles, está en una cantidad equivalente a la dosis semanal total recomendada de la IL-2 de referencia convencional, es decir Proleukin® IL-2, tal como se determina con el área bajo la curva concentración sérica-tiempo procedente de datos PK humanos.

Cálculo de la dosis de IL-2 para diferentes moléculas de IL-2

Variantes biológicamente activas de IL-2 pueden tener alterada la actividad biológica intrínseca. Para estimar la dosis de una variante de IL-2 aparte de la aldesleukina o la dosis de IL-2 de secuencia nativa que será comparable a las dosis de aldesleukina divulgadas en el presente documento, la actividad biológica relativa de la variante de IL-2 o la IL-2 de secuencia nativa se determinará analizando su efecto biológico.

La actividad biológica relevante de una IL-2 o su variante de acuerdo con la presente invención es la capacidad para activar y/o conseguir expansión de células NK humanas para mediar la actividad asesina activada por linfocinas (LAK) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Tal actividad se mide usando un ensayo convencional como el descrito en Nagler y col. (1989) J. Immunol. 143:3183-3191. Para determinar las dosis adecuadas de variantes de IL-2 que no son aldesleukina o dosis adecuadas de IL-2 de secuencia nativa se administran una serie de dosis de la molécula de IL-2 de interés (es decir, una variante de IL-2 distinta a la aldesleukina o a la IL-2 de secuencia nativa) a sujetos humanos mediante la misma vía de administración y en los PBMC (células mononucleares de sangre periférica) recién aislados de los sujetos se analiza la citotoxicidad NK contra las células K562, tal como describen, por ejemplo, Nagler y col. (1989) *ant.*). El efecto estimulador de NK de la molécula de IL-2 que se está analizando se compara con el de la IL-2 de referencia convencional (Es decir, aldesleukina tal como está formulada en Proleukin®) cuando se administra en las mismas cantidades de μg por la misma vía de administración usando el mismo procedimiento descrito para la IL-2 que se está analizando. Como alternativa se podrían determinar dosis adecuadas *in vitro* usando PBMC humanos no tratados sometidos a una serie de dosis de la molécula de IL-2 de interés. La molécula de IL-2 de interés (es decir, una variante de IL-2 distinta a aldesleukina o a la IL-2 de secuencia nativa) tendrán una potencia estimuladora de células NK (es decir, actividad) que es, preferentemente, al menos el 100% de la de la misma cantidad de la IL-2 de referencia convencional (es decir, aldesleukina como está formulada en Proleukin®), o el 95%, 90%, 80%, 70%, o 60% de la de la misma cantidad de la IL-2 de referencia convencional. La variante de IL-2 deberá ser sustancialmente biológicamente activa, definida como que posee al menos un 50% de la actividad estimuladora de NK de la misma dosis de la IL-2 de referencia convencional administrada por la misma vía.

Por tanto, cuando un sujeto va a recibir terapia de combinación con anticuerpo anti CD40 antagonista y un régimen de dosificación constante de IL-2, la dosis semanal total de cualquier IL-2 o su variante biológicamente activa es una cantidad equivalente a una dosis semanal total de la IL-2 de referencia convencional (es decir, aldesleukina como está formulada en Proleukin®) en el intervalo de aproximadamente 1100 μg (es decir, 18,0 MUI) a aproximadamente 3300 μg (es decir, aproximadamente 54,0 MUI), preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1100 μg a aproximadamente 2567 μg (es decir, aproximadamente 42,0 MUI), en la que la dosis semanal total de la IL-2 o su variante biológicamente activa es una cantidad que proporciona al menos un 50% de la actividad estimuladora de NK de la dosis semanal total de la IL-2 de referencia convencional (es decir, aldesleukina como está formulada en Proleukin®).

En algunas formas de realización, la dosis semanal total de la IL-2 o su variante biológicamente activa que se va a administrar en el régimen de dosificación constante de IL-2 es una cantidad que proporciona al menos un 60% de la actividad estimuladora de NK de una dosis semanal total de la IL-2 de referencia convencional en el intervalo de aproximadamente 1100 μg a aproximadamente 3300 μg , por ejemplo al menos un 60% de la actividad estimuladora de NK de una dosis semanal total de la IL-2 de referencia convencional administrada a aproximadamente 1100 μg (18,0 MUI), 1222 μg (20,0 MUI), 1345 μg (22,0 MUI), 1467 μg (24,0 MUI), 1589 μg (26,0 MUI), 1711 μg (28,0 MUI), 1834 μg (30,0 MUI), 1956 μg (32,0 MUI), 2078 μg (34,0 MUI), 2200 μg (36,0 MUI), 2323 μg (38,0 MUI), 2445 μg (40,0 MUI), 2567 μg (42,0 MUI), 2689 μg (44,0 MUI), 2812 μg (46,0 MUI), 2934 μg (48,0 MUI), 3056 μg (50,0 MUI), 3178 μg (52,0 MUI), o 3300 μg (54,0 MUI). En otras formas de realización, la dosis semanal total de la IL-2 o su variante biológicamente activa que se va a administrar en el régimen de dosificación constante de IL-2 es una cantidad que proporciona al menos un 70% de la actividad estimuladora de NK de una dosis semanal total de la IL-2 de referencia convencional en el intervalo de aproximadamente 1100 μg a aproximadamente 3300 μg , por ejemplo al menos un 70% de la actividad estimuladora de NK de una dosis semanal total de la IL-2 de referencia convencional administrada a aproximadamente 1100 μg (18,0 MUI), 1222 μg (20,0 MUI), 1345 μg (22,0 MUI), 1467 μg (24,0 MUI), 1589 μg (26,0 MUI), 1711 μg (28,0 MUI), 1834 μg (30,0 MUI), 1956 μg (32,0 MUI), 2078 μg (34,0 MUI), 2200 μg (36,0 MUI), 2323 μg (38,0 MUI), 2445 μg (40,0 MUI), 2567 μg (42,0 MUI), 2689 μg (44,0 MUI), 2812 μg (46,0 MUI), 2934 μg (48,0 MUI), 3056 μg (50,0 MUI), 3178 μg (52,0 MUI), o 3300 μg (54,0 MUI).

En algunas formas de realización, la dosis semanal total de la IL-2 o su variante biológicamente activa que se va a administrar en el régimen de dosificación constante de IL-2 es una cantidad que proporciona al menos un 80% de la actividad estimuladora de NK de una dosis semanal total de la IL-2 de referencia convencional en el intervalo de

aproximadamente 1100 µg a aproximadamente 3300 µg, por ejemplo al menos un 80% de la actividad estimuladora de NK de una dosis semanal total de la IL-2 de referencia convencional administrada a aproximadamente 1100 µg (18,0 MUI), 1222 µg (20,0 MUI), 1345 µg (22,0 MUI), 1467 µg (24,0 MUI), 1589 µg (26,0 MUI), 1711 µg (28,0 MUI), 1834 µg (30,0 MUI), 1956 µg (32,0 MUI), 2078 µg (34,0 MUI), 2200 µg (36,0 MUI), 2323 µg (38,0 MUI), 2445 µg (40,0 MUI), 2567 µg (42,0 MUI), 2689 µg (44,0 MUI), 2812 µg (46,0 MUI), 2934 µg (48,0 MUI), 3056 µg (50,0 MUI), 3178 µg (52,0 MUI), o 3300 µg (54,0 MUI). En formas de realización alternativas, la dosis semanal total de la IL-2 o su variante biológicamente activa que se va a administrar en el régimen de dosificación constante de IL-2 es una cantidad que proporciona al menos un 90% de la actividad estimuladora de NK de una dosis semanal total de la IL-2 de referencia convencional en el intervalo de aproximadamente 1100 µg a aproximadamente 3300 µg, por ejemplo al menos un 90% de la actividad estimuladora de NK de una dosis semanal total de la IL-2 de referencia convencional administrada a aproximadamente 1100 µg (18,0 MUI), 1222 µg (20,0 MUI), 1345 µg (22,0 MUI), 1467 µg (24,0 MUI), 1589 µg (26,0 MUI), 1711 µg (28,0 MUI), 1834 µg (30,0 MUI), 1956 µg (32,0 MUI), 2078 µg (34,0 MUI), 2200 µg (36,0 MUI), 2323 µg (38,0 MUI), 2445 µg (40,0 MUI), 2567 µg (42,0 MUI), 2689 µg (44,0 MUI), 2812 µg (46,0 MUI), 2934 µg (48,0 MUI), 3056 µg (50,0 MUI), 3178 µg (52,0 MUI), o 3300 µg (54,0 MUI).

En otras formas de realización más, la dosis semanal total de la IL-2 o su variante biológicamente activa que se va a administrar en el régimen de dosificación constante de IL-2 es una cantidad que proporciona al menos un 95% de la actividad estimuladora de NK de una dosis semanal total de la IL-2 de referencia convencional en el intervalo de aproximadamente 1100 µg a aproximadamente 3300 µg, por ejemplo al menos un 95% de la actividad estimuladora de NK de una dosis semanal total de la IL-2 de referencia convencional administrada a aproximadamente 1100 µg (18,0 MUI), 1222 µg (20,0 MUI), 1345 µg (22,0 MUI), 1467 µg (24,0 MUI), 1589 µg (26,0 MUI), 1711 µg (28,0 MUI), 1834 µg (30,0 MUI), 1956 µg (32,0 MUI), 2078 µg (34,0 MUI), 2200 µg (36,0 MUI), 2323 µg (38,0 MUI), 2445 µg (40,0 MUI), 2567 µg (42,0 MUI), 2689 µg (44,0 MUI), 2812 µg (46,0 MUI), 2934 µg (48,0 MUI), 3056 µg (50,0 MUI), 3178 µg (52,0 MUI), o 3300 µg (54,0 MUI).

En algunas formas de realización, la dosis semanal total de la IL-2 o su variante biológicamente activa que se va a administrar en el régimen de dosificación constante de IL-2 es una cantidad que proporciona un 100% de la actividad estimuladora de NK de una dosis semanal total de la IL-2 de referencia convencional en el intervalo de aproximadamente 1100 µg a aproximadamente 3300 µg, por ejemplo un 100% de la actividad estimuladora de NK de una dosis semanal total de la IL-2 de referencia convencional administrada a aproximadamente 1100 µg (18,0 MUI), 1222 µg (20,0 MUI), 1345 µg (22,0 MUI), 1467 µg (24,0 MUI), 1589 µg (26,0 MUI), 1711 µg (28,0 MUI), 1834 µg (30,0 MUI), 1956 µg (32,0 MUI), 2078 µg (34,0 MUI), 2200 µg (36,0 MUI), 2323 µg (38,0 MUI), 2445 µg (40,0 MUI), 2567 µg (42,0 MUI), 2689 µg (44,0 MUI), 2812 µg (46,0 MUI), 2934 µg (48,0 MUI), 3056 µg (50,0 MUI), 3178 µg (52,0 MUI), o 3300 µg (54,0 MUI).

De un modo similar, cuando un sujeto va a recibir terapia de combinación con anticuerpo anti CD40 antagonista y un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles, la dosis semanal total de cualquiera IL-2 o su variante biológicamente activa que se va a administrar durante el primer periodo o durante el segundo periodo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles se puede expresar en forma de una cantidad equivalente a la dosis semanal total de la IL-2 de referencia convencional que se administra durante el régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles. Por tanto, la dosis semanal total de cualquiera IL-2 o su variante biológicamente activa que se va a administrar durante el primer periodo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles es una cantidad equivalente a una dosis semanal total de la IL-2 de referencia convencional (es decir, aldesleukina como está formulada en Proleukin®) en el intervalo de aproximadamente 1834 µg (es decir, 30,0 MUI) a aproximadamente 3300 µg (es decir, 54,0 MUI), en la que la dosis semanal total de la IL-2 o su variante biológicamente activa es una cantidad que proporciona al menos un 50% de la actividad estimuladora de NK de la dosis semanal total de la IL-2 de referencia convencional (es decir, aldesleukina como está formulada en Proleukin®). De forma similar, la dosis semanal total de cualquiera IL-2 o su variante biológicamente activa que se va a administrar durante el segundo periodo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles es una cantidad equivalente a una dosis semanal total de la IL-2 de referencia convencional (es decir, aldesleukina como está formulada en Proleukin®) en el intervalo de aproximadamente 1100 µg (es decir, 18,0 MUI) a aproximadamente 2384 µg (es decir, 39,0 MUI), en la que la dosis semanal total de la IL-2 o su variante biológicamente activa es una cantidad que proporciona al menos un 50% de la actividad estimuladora de NK de la dosis semanal total de la IL-2 de referencia convencional (es decir, aldesleukina como está formulada en Proleukin®). Como se ha indicado anteriormente, la dosis semanal total administrada durante el primer periodo de tiempo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles, por ejemplo durante la primera mitad de este régimen de dosificación, siempre es mayor que la dosis semanal total administrada durante el segundo periodo de tiempo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles, por ejemplo durante la segunda mitad de este régimen de dosificación.

Por tanto, en algunas formas de realización, la dosis semanal total de la IL-2 o su variante biológicamente activa que se va a administrar en el primer periodo del régimen de dosificación constante de IL-2 es una cantidad que proporciona al menos un 60% de la actividad estimuladora de NK de una dosis semanal total de la IL-2 de referencia convencional administrada en el intervalo de aproximadamente 1834 µg (es decir, 30,0 MUI) a aproximadamente 3300 µg (es decir, 54,0 MUI), por ejemplo al menos un 60% de la actividad estimuladora de NK de una dosis semanal total de la IL-2 de referencia convencional administrada a aproximadamente 1834 µg (30,0 MUI), 1956 µg (32,0 MUI), 2078 µg (34,0 MUI), 2200 µg (36,0 MUI), 2323 µg (38,0 MUI), 2445 µg (40,0 MUI), 2567 µg (42,0 MUI), 2689 µg (44,0 MUI), 2812 µg (46,0 MUI), 2934 µg (48,0 MUI), 3056 µg (50,0 MUI), 3178 µg (52,0 MUI) o 3300 µg (54,0 MUI). Para estas formas de realización, la dosis semanal total de la IL-2 o su variante biológicamente activa que se va a administrar en el segundo periodo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles es una cantidad que

variante biológicamente activa que se va a administrar en el segundo periodo del régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles es una cantidad que proporciona al menos un 70%, al menos un 90%, al menos un 95%, o incluso el 100% de la actividad estimuladora de NK de una dosis semanal total de la IL-2 de referencia convencional administrada en el intervalo de aproximadamente 1100 µg (es decir, 18,0 MUI) a aproximadamente 2384 µg (es decir, aproximadamente 39,0 UMI), por ejemplo al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95% o incluso el 100% de la actividad estimuladora de NK de una dosis semanal total de la IL-2 de referencia convencional administrada a aproximadamente 1100 µg (18,0 MUI), 1222 µg (20,0 MUI), 1406 µg (23,0 MUI), 1528 µg (25,0 MUI), 1650 µg (27,0 MUI), 1834 µg (30,0 MUI), 1956 µg (32 MUI), 2139 µg (35,0 MUI), 2262 µg (37,0 MUI) o 2384 µg (39,0 MUI).

10 Oncoterapia adicional para usar con la terapia de combinación IL-2/anticuerpo anti CD40

Los expertos en la técnica reconocen que los procedimientos de terapia de combinación divulgados en el presente documento pueden usarse antes, después o a la vez con otras formas de oncoterapia. Tal oncoterapia puede incluir regímenes de quimioterapia tales como tratamiento con CVP (ciclofosfamida, vincristina y prednisona), CHOP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona más doxorubicina), ICE (ifosfamida, carboplatino y etopósido), mitoxantrona, citarabina, DVP (daunorubicina, prednisona y vincristina), ATRA (ácido todo-trans-retinoico), idarubicina, régimen quimioterapéutico de hoelzer, régimen de quimioterapia La La, ABVD (adriamicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazina), CEOP (ciclofosfamida, epirubicina, vincristina y prednisona), CEOP-BE (ciclofosfamida, epirubicina, vincristina, prednisona, bleomicina y etopósido), 2-CdA (2-clorodesoxiadenosina (2-CdA)), FLAG e IDA (fludarabina, citarabina e idarubicina; con o sin tratamiento posterior G-LCR), VAD (vincristina, doxorubicina y dexametasona), M y P (melfalán y prednisona), C-semanal (ciclofosfamida y prednisona), ABCM (adriamicina (doxorubicina), BCNU, ciclofosfamida y melfalán), MOPP (mostaza nitrógeno, oncovina, procarbazona y prednisona), DHAP (dexametasona, dosis altas de ara-C y platinol), fludarabina y ciclofosfamida. Como alternativa, dichas oncoterapias pueden incluir cirugía o procedimientos quirúrgicos, incluidos radioterapia, incluidas las terapias de mieloablación, u otra terapia anticancerosa con anticuerpos monoclonales. Por tanto, los procedimientos descritos en el presente documento son útiles como tratamiento concurrente para matar células tumorales residuales, bien *in vivo* o *ex vivo* tras dichas oncoterapias.

De esta manera, la terapia de combinación con IL-2 (o su variante biológicamente activa) y los anticuerpos anti CD40 antagonistas descritos en el presente documento, o sus fragmentos de unión al antígeno, se pueden usar en combinación con al menos otra terapia contra el cáncer, incluidas, entre otras, cirugía o procedimientos quirúrgicos (por ejemplo, esplenectomía, hepatectomía, linfadenectomía, leucoforesis, trasplante de médula ósea, y similares); radioterapia; quimioterapia, opcionalmente en combinación con trasplante autólogo de médula ósea, en las que los agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, fludarabina o fosfato de fludarabina, clorambucilo, vincristina, pentostatina, 2-clorodesoxiadenosina (cladribina), ciclofosfamida, doxorubicina, prednisona, y sus combinaciones, por ejemplo, regímenes que contienen antraciclina tales como CAP (ciclofosfamida, doxorubicina más prednisona), CHOP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona más doxorubicina), VAD (vincristina, doxorubicina, más dexametasona), MP (melfalán más prednisona), y otros agentes citotóxicos y/o terapéuticos usados en quimioterapia tales como mitoxantrona, daunorubicina, idarubicina, asparaginasa, y antimetabolitos, incluidos, pero no limitados a, citarabina, metotrexato, 5-fluorouracilo decarbazina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina y nelarabina; otra terapia anticancerosa con anticuerpos monoclonales (por ejemplo, alemtuzumab (Campath®) u otro anticuerpo anti CD52 dirigido a la glicoproteína de superficie celular CD52 en células B malignas; rituximab (Rituxan®), el anticuerpo HuMax-CD20 totalmente humano, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar®), ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), o cualquier otro anticuerpo anti CD20 terapéutico dirigido al antígeno CD20 en células B malignas; anticuerpo anti CD19 (por ejemplo, MT103, un anticuerpo biespecífico); anticuerpo anti CD22 (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal humanizado epratuzumab); bevacizumab (Avastin®) u otro anticuerpo anticanceroso dirigido al factor de crecimiento vascular endotelial humano; anticuerpo anti CD22 dirigido al antígeno CD22 en células B malignas (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal BL-22, una toxina alfaCD22); anticuerpo α-M-CSF dirigido al factor estimulante de colonias de macrófagos; anticuerpos dirigidos al activador del receptor del factor kappaB nuclear (RANK) y su ligando (RANKL), que se sobreexpresan en el mieloma múltiple; anticuerpo anti CD23 dirigido al antígeno CD23 en células B malignas (por ejemplo, IDEC-152); anticuerpo anti CD80 dirigido al antígeno CD80 (por ejemplo, IDEC-114); anticuerpo anti CD38 dirigido al antígeno CD38 en células B malignas; anticuerpos dirigidos a los receptores del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (anticuerpos anti MHC) expresados en células B malignas; otros anticuerpos anti CD40 (por ejemplo, SGN-40) dirigidos al antígeno CD40 en células B malignas; y anticuerpos dirigidos al receptor 1 del ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL-R1) (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal agonista humano HGS-ETR1) y TRAIL-R2 expresado en una cantidad de tumores sólidos y tumores de origen hematopoyético); terapia del cáncer basada en moléculas pequeñas, incluidos, pero no limitados a, inhibidores de microtúbulos y/o topoisomerasa (por ejemplo, el inhibidor mitótico dolastatina y análogos de dolastatina; el agente de unión a tubulina T900607; XL119; y el inhibidor de la topoisomerasa aminocamptotecina), SDX-105 (clorhidrato de bendamustina), ixabepilona (un análogo de epotilona, también llamado BMS-247550), inhibidores de proteínasa C, por ejemplo, midostaurina ((PKC-412, CGP 41251, N-benzoilstaurosporina), pixantrona, eloxatina (un agente antineoplásico), ganite (nitrato de galio), Thalomid® (talidomida), derivados inmunomoduladores de la talidomida (por ejemplo, revlimid (anteriormente revimid)), Affinitak™ (inhibidor antisentido de proteínasa C-alfa), SDX-101 (R-etodolac, que induce la apoptosis de linfocitos malignos), análogos de nucleósidos purina de segunda generación tales como clofarabina, inhibidores de la producción de la proteína Bcl-2 por células cancerosas (por ejemplo, los agentes antisentido oblimersen y Genasense®), inhibidores de proteasoma (por ejemplo, Velcade™ (bortezomib)), inhibidores de cinasas de molécula pequeña (por ejemplo, CHIR-258), inhibidores de VEGF de molécula pequeña (por ejemplo, ZD-6474), inhibidores de la proteína del choque térmico (HSP) 90 de molécula pequeña (por ejemplo, 17-AAG), agentes inhibidores de desacetilasas de histonas de molécula

pequeña (por ejemplo, HPC híbrido/polar de citodiferenciación) tales como ácido suberilohidroxámico (SAHA), y FR-901228 y agentes apoptóticos tales como Trisenox® (tríóxido de arsénico) y Xcytrin® (motexafina gadolinio); terapias contra el cáncer basadas en vacunas/inmunoterapia, incluidas, pero no limitadas a, enfoques de vacunas (por ejemplo, Id-KLH, oncofago, viraletina), inmunoterapia personalizada o inmunoterapia activa de idiotipo (por ejemplo, MyVax® Personalized Immunotherapy, denominada formalmente GTOP-99), Promune® (CpG 7909, un agonista sintético para el receptor de tipo toll 9 (TLR9)), terapia con interferón alfa, terapia con IL-12, terapia con IL-15 y terapia con IL-21; terapia con esteroides; u otra terapia contra el cáncer; en las que la terapia anticancerosa adicional se administra antes de, durante, o posteriormente a la terapia de combinación con IL-2/anticuerpo anti CD40 antagonista. Por consiguiente, cuando las terapias combinadas comprenden la administración de IL-2/anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno en combinación con la administración de otro agente terapéutico, como con quimioterapia, radioterapia, otra terapia anticancerosa con anticuerpos, terapia contra el cáncer basada en moléculas pequeñas, o terapia contra el cáncer basada en vacunas/inmunoterapia, los procedimientos dados a conocer en el presente documento abarcan la coadministración, usando formulaciones separadas de una formulación farmacéutica única, y/o la administración consecutiva en cualquier orden. Cuando los procedimientos dados a conocer en el presente documento comprenden regímenes terapéuticos combinados, estas terapias pueden darse de manera simultánea, es decir, el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno se administra simultáneamente o dentro del mismo período de tiempo que la otra terapia contra el cáncer (es decir, las terapias tienen lugar simultáneamente, pero la terapia de combinación con IL-2/anticuerpo anti CD40 antagonista no se administra precisamente en el mismo momento que la otra terapia contra el cáncer). Como alternativa, la terapia de combinación con IL-2/anticuerpo anti CD40 antagonista de la presente puede también administrarse antes de, o posteriormente a la otra terapia contra el cáncer. La administración secuencial de las diferentes terapias contra el cáncer puede realizarse independientemente de que el sujeto tratado responda al primer curso de terapia para disminuir la posibilidad de remisión o recaída.

Por tanto, por ejemplo, en algunas formas de realización, un sujeto sometido a la terapia de combinación con IL-2/anticuerpo anti CD40 antagonista divulgada en el presente documento también recibe terapia con FCR (fludarabina, ciclofosfamida, rituximab y alemtuzumab). En formas de realización alternativas, un sujeto sometido a la terapia de combinación con IL-2/anticuerpo anti CD40 antagonista divulgada en el presente documento también recibe terapia con FC (fludarabina, ciclofosfamida) y cualquier otro anticuerpo anti CD20 dirigido al antígeno CD20 en células B malignas, incluidos, entre otros, el anticuerpo HuMax-CD20 totalmente humano, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar®) e ibritumomab tiuxetan (Zevalin®). En formas de realización más, un sujeto sometido a la terapia de combinación con IL-2/anticuerpo anti CD40 antagonista divulgada en el presente documento también recibe terapia con CHOP más otro anticuerpo anti CD20 o CFA (fludarabina, ciclofosfamida y alemtuzumab) más otro anticuerpo anti CD20, en el que el otro anticuerpo anti CD20 está dirigido al antígeno CD20 sobre células B malignas, incluidos, entre otros, el anticuerpo HuMax-CD20 totalmente humano, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar®) e ibritumomab tiuxetan (Zevalin®).

Interleucina-2 y variantes biológicamente activas de la misma

La IL-2 descrita en las formulaciones farmacéuticas expuestas en el presente documento y que se va a usar en los procedimientos descritos en el presente documento puede ser nativa u obtenerse mediante técnicas recombinantes, y puede proceder de cualquier fuente, incluidas fuentes de mamíferos tales como, por ejemplo, de rata, conejo, primate, cerdo y ser humano. Cuando el sujeto sometido a tratamiento es un sujeto humano, la IL-2 deriva, preferentemente, de una fuente humana e incluye IL-2 humana que se produce de forma recombinante, tal como polipéptidos de IL-2 recombinante producidos por huéspedes microbianos.

Inicialmente, la IL-2 humana se traduce en forma de un precursor polipeptídico, que se muestra en la SEC ID N° 14, que está codificado por una secuencia nucleotídica tal como la que se expone en la SEC ID N° 13. El precursor polipeptídico incluye una secuencia señal en los residuos 1-20 de la SEC ID N° 14. El término "IL-2 humana madura" se refiere a la secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N° 16, que está codificada por una secuencia de nucleótidos tal como la que se expone como SEC ID N° 15. Los términos "IL-2 des-alanil-1, C125S humana" y "IL-2 des-alanil-1, serina 125 humana" se refieren a una muteína de IL-2 humana madura que tiene una sustitución de serina por cisteína en la posición del aminoácido 125 de la secuencia de IL-2 humana madura y que carece de la alanina N-terminal que reside en la posición 1 de la secuencia de IL-2 humana madura (es decir, en la posición 1 de la SEC ID N° 16). La IL-2 des-alanil-1, C125S humana tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 18, que está codificada por una secuencia de nucleótidos, tal como la que se expone en la SEC ID N° 17. La muteína IL-2 des-alanil-2, C125S humana, que se denomina "aldesleukina", está disponible comercialmente en forma de una formulación que se comercializa con la marca Proleukin® (Chiron Corporation, Emeryville, California). La IL-2 sirve como la IL-2 de referencia convencional para determinar los intervalos de dosificación de IL-2 adecuados para los protocolos de la terapia de combinación con IL-2/anticuerpo anti CD40 antagonista que se describen en el presente documento.

Variantes biológicamente activas de IL-2

Las composiciones farmacéuticas útiles en los procedimientos descritos en el presente documento pueden comprender variantes biológicamente activas de IL-2. Dichas variantes deberán conservar la actividad biológica del polipéptido nativo de modo que la composición farmacéutica que comprenden el polipéptido variante tiene el mismo efecto terapéutico que la composición farmacéutica que comprende el polipéptido nativo cuando se administra a un sujeto. Es decir, el polipéptido variante servirá como componente terapéuticamente activo en la composición farmacéutica de un modo similar al observado para el polipéptido nativo. En la técnica se dispone de procedimientos para

determinar si un polipéptido variante conserva la actividad biológica deseada y, por tanto, sirve como componente terapéuticamente activo en la composición farmacéutica. La actividad biológica se puede medir usando ensayos diseñados específicamente para medir la actividad del polipéptido o proteína nativo, incluidos los ensayos descritos en el presente documento.

Adicionalmente se pueden analizar los anticuerpos producidos contra un polipéptido nativo biológicamente activo según su capacidad para unirse al polipéptido variante, en la que la unión eficaz es indicativa de un polipéptido que tiene una conformación similar a la del polipéptido nativo.

Para los fines de la presente invención, la actividad biológica de la IL-2 de interés es la capacidad de la IL-2 para activar y/o expandir las células asesinas naturales (NK) para mediar la actividad asesina activada por linfocinas (LAK) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Por tanto, una variante de IL-2 (por ejemplo, una mutéina de IL-2 humana) para usar en los procedimientos descritos en el presente documento activará y/o expandirá las células asesinas naturales (NK) para mediar la actividad asesina activada por linfocinas (LAK) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Las células NK median la citotoxicidad espontánea o natural contra ciertas dianas celulares *in vitro* denominadas dianas "sensibles a las células NK", tales como la línea celular K562 de eritroleucemia humana. Tras la activación por la IL-2, las células NK adquieren actividad LAK. Tal actividad LAK se puede analizar mediante la capacidad de las células NK activadas por la IL-2 para matar a una amplia variedad de células tumorales y otras dianas "no sensibles a NK", tal como la línea de linfoma de células B de Daudi, que normalmente son resistentes a la lisis por células NK en reposo (no activadas). De forma similar, la actividad ADCC se puede analizar mediante la capacidad de células NK activadas por IL-2 para lisar las células diana "no sensibles a NK", tal como la línea de linfoma de células B de Daudi, u otras células diana no lisadas con facilidad por células NK en reposo en presencia de concentraciones óptimas de anticuerpos específicos de células tumorales relevantes. En la técnica se conocen procedimientos para generar y medir la actividad citotóxica de células NK/LAK y ADCC. Véase, por ejemplo, *Current Protocols in Immunology: Immunologic Studies in Humans*, Suplemento 17, Unidad 7.7.7.18, y 7.27 (John Wiley & Sons, Inc., 1996).

Para los fines de la presente invención, las células NK activadas por una variante de IL-2 para usar en los procedimientos descritos en el presente documento demuestran una actividad de lisis específica de células no sensibles a NK en presencia (Actividad ADCC) o ausencia (actividad LAK) de anticuerpo, más particularmente células de Daudi no sensibles a NK en presencia de anticuerpos específicos de células B, incluido rituximab, es decir al menos aproximadamente 20% mayor, o al menos aproximadamente 25%, o 30% o 35% o 40% mayor que la actividad de lisis basal de las células NK en reposo (es decir, no activadas) medida usando un efector dirigido a proporciones entre 12,5 a 50:1 en un ensayo convencional de citotoxicidad de liberación de ⁵¹Cr de 4 horas (véase, *Current Protocols in Immunology: Immunologic Studies in Humans*, Unidad 7.7, Suplemento 17, Sección 17.18.1 (John Wiley & Sons, Inc., 1996).

En algunas formas de realización, la actividad de lisis específica de estas células NK activadas por variante de IL-2 es al menos aproximadamente 45% mayor, al menos aproximadamente 50% mayor, al menos aproximadamente 55% mayor, al menos aproximadamente 60% mayor, al menos aproximadamente 65% mayor, al menos aproximadamente 70% mayor, al menos aproximadamente 75% mayor o al menos aproximadamente 80% mayor que la actividad de lisis basal de las células NK en reposo cuando se mide como se ha indicado en lo que antecede.

Variantes biológicamente activas de la IL-2 nativa o natural pueden ser fragmentos, análogos y derivados de dicho polipéptido. Por "fragmento" se entiende un polipéptido constituido por sólo una parte de la secuencia y estructura polipeptídicas intactas y puede ser una delección en el extremo C o una delección en el extremo N del polipéptido nativo. Por "análogo" se entiende un análogo del polipéptido nativo o de un fragmento del polipéptido nativo, en el que el análogo comprende una secuencia y estructura del polipéptido nativo que tiene una o más sustituciones, inserciones o delecciones de aminoácidos. "Mutéinas", tales como las que se describen en el presente documento, y péptidos que tienen uno o más peptoides (similares a péptidos) también entran en el término análogo (véase la publicación internacional n° WO 91/04282). Por "derivado" se entiende cualquier modificación adecuada del polipéptido nativo de interés, de un fragmento del polipéptido nativo o de sus respectivos análogos, tales como glicosilación, fosforilación, conjugación polimérica (tal como con polietilenglicol), u otra adición de restos extraños, siempre que se conserve la actividad biológica deseada del polipéptido nativo. Por lo general, en la técnica están disponibles procedimientos para producir fragmentos, análogos y derivados polipeptídicos.

Por ejemplo, pueden prepararse variantes de secuencias de aminoácidos del polipéptido, por medio de mutaciones en la secuencia de ADN clonada que codifica el polipéptido de interés. Los procedimientos para mutagénesis y alteraciones de secuencias de nucleótidos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Walker y Gastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, Nueva York); Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488-492; Kunkel y col. (1987) *Methods Enzymol.* 154: 367-382; Sambrook y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, Nueva York); Patente de EEUU N° 4.873.192; y las referencias citadas en la misma. En el modelo de Dayhoff y col. (1978) en *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.) puede encontrarse orientación para sustituciones adecuadas de aminoácidos que no afectan la actividad biológica del polipéptido de interés.

Las sustituciones conservadoras, tales como los intercambios de un aminoácido con otro que tiene propiedades similares, pueden ser de preferencia. Los ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen, pero no se limitan a, Gly⇌Ala, Val⇌Ile⇌Leu, Asp⇌Glu, Lys⇌Arg, Asn⇌Gln y Phe⇌Trp⇌Tyr.

En la construcción de variantes del polipéptido de IL-2, las modificaciones se realizan de manera tal que las variantes sigan teniendo la actividad deseada. Obviamente, cualquier mutación realizada en el ADN que codifica la variante polipéptido no debe colocar a la secuencia fuera del marco de lectura y de preferencia no creará regiones complementarias que podrían producir una estructura de ARNm secundaria. Véase Publicación de Solicitud de Patente N° 75.444.

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

Variantes biológicamente activas de IL-2 tendrán, en general, al menos 70% de preferencia al menos 80%, de más preferencia al menos de 90% a 95% o más, y, más preferentemente, al menos 96%, 97%, 98% ó 99% de homología de secuencia de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos para la molécula polipeptídica de referencia, que sirve de base para la comparación. Por tanto, cuando la molécula de IL-2 de referencia es IL-2 humana, una variante biológicamente activa de la misma tendrá al menos 70%, preferentemente al menos 80%, más preferentemente al menos de 90% a 95% o más y, más preferentemente al menos 96%, 97%, 98% ó 99% de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la IL-2 humana.

Para los fines de la presente invención, el porcentaje de homología de secuencia se determina usando el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda de huecos afines con parámetros de penalización de hueco abierto de 12 y penalización de extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se enseña en Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489. Una variante puede, por ejemplo, diferir de la secuencia de IL-2 de referencia en tan pocos como 1 a 15 residuos de aminoácidos, tan pocos como 1 a 10 residuos de aminoácidos, tal como 6-10, tan pocos como 5, tan pocos como 4, 3, 2, o incluso 1 residuo de aminoácido.

Con respecto a la alineación óptima de dos secuencias de aminoácidos, el segmento contiguo de la secuencia de aminoácidos variante puede tener residuos de aminoácidos adicionales o residuos de aminoácidos delecionados con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia. El segmento contiguo utilizado para la comparación con la secuencia de aminoácidos de referencia incluirá al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos y puede tener 30, 40, 50, 100 o más residuos de aminoácidos. Pueden hacerse correcciones para homología de secuencia asociadas con huecos o sustituciones conservadoras de residuos (véase el algoritmo de búsqueda de Smith-Waterman).

La estructura química exacta de un polipéptido que tiene actividad IL-2, depende de una serie de factores. Como en la molécula están presentes grupos amino y carboxilo ionizables, puede obtenerse un polipéptido particular como una sal ácida o básica, o en forma neutra. Todas las preparaciones que retienen su actividad biológica cuando se colocan en condiciones ambientales adecuadas están incluidas en la definición de polipéptidos que tienen actividad IL-2 como se usan en el presente documento. Además, puede aumentarse la secuencia de aminoácidos principal del polipéptido por derivatización con restos de azúcar (glicosilación) o por otras moléculas complementarias tales como lípidos, fosfato, grupos acetilo y similares. También puede aumentarse por conjugación con sacáridos. Ciertos aspectos de tal aumento se realizan a través de sistemas de procesamiento postraduccionales del huésped productor; otras de tales modificaciones pueden introducirse *in vitro*. En cualquier caso, tales modificaciones están incluidas en la definición de un polipéptido IL-2 usada en el presente documento siempre que no se destruyan la actividad IL-2 del polipéptido. Se espera que tales modificaciones puedan afectar cuantitativamente o cualitativamente a la actividad, ya sea aumentando o disminuyendo la actividad del polipéptido, en los diversos ensayos. Además, pueden modificarse residuos de aminoácidos individuales en la cadena por oxidación, reducción u otra derivatización, y el polipéptido puede escindirse para obtener fragmentos que retengan la actividad. Tales alteraciones que no destruyen la actividad antagonista no retiran a la secuencia del polipéptido de la definición de polipéptidos IL-2 de interés según se utiliza en el presente documento.

La técnica proporciona orientación sustancial con respecto a la preparación y al uso de las variantes de polipéptidos. En la preparación de las variantes de IL-2, un experto en la técnica puede determinar fácilmente qué modificaciones a la secuencia de nucleótidos o aminoácidos de la proteína nativa darán como resultado una variante que sea adecuada para uso como un componente terapéuticamente activo de una composición farmacéutica utilizada en los procedimientos dados a conocer en el presente documento.

Para ejemplos de proteínas variantes de IL-2, véase la publicación de patente europea (EP) n° EP 136.489 (que describe una o más de las alteraciones siguientes en la secuencia de aminoácidos de la IL-2 natural: Asn26 a Gln26; Trp121 a Phe121; Cys58 a Ser58 o Ala58, Cys125 a Ser125 o Ala125; Cys125 a Ser125 o Ala125; delección de todos los residuos tras la Arg 120; y las formas Met-1 de la misma; y las muteínas de IL-2 recombinantes descritas en la solicitud de patente europea EP 0 109 748, que es la equivalente a la patente belga n° 893.016, y la patente de EE.UU. de propiedad común n° 4.518.584 (que divulgan la muteína de IL-2 humana recombinante en la que la cisteína en la posición 125, numerada de acuerdo con la IL-2 humana nativa, se ha eliminado o sustituido por un aminoácido neutro; alanil-ser125-IL-2; y des-alanil-ser125-IL2). Véase también la patente de EE.UU. n° 4.752.585 (que divulga las siguientes variantes de proteínas de IL-2: ala104 ser125 IL-2, ala104 IL-2, ala104 ala125 IL-2, val104 ser125 IL-2, val104 IL-2, val104 ala125 IL-2, des-ala1 ala104 ser125 IL-2, des-ala1 ala104 IL-2, des-ala1 ala104 ala125 IL-2, des-ala1 val104 ser125 IL-2, des-ala1 val104 IL-2, des-ala1 val104 ala125 IL-2, des-ala1 des-pro2 ala104 ser125 IL-

2, des-ala1 des-pro2 ala104 IL-2, des-ala1 des-pro2 ala104 ala125 IL-2, des-ala1 des-pro2 val104 ser125 IL-2, des-ala1 des-pro2 val104 IL-2, des-ala1 des-pro2 val104 ala125 IL-2, des-ala1 despro2 des-thr3 ala104 ser125 IL-2, des-ala1 des-pro2 des-thr3 ala104 IL-2, des-ala1 des-pro2 des-thr3 ala104 ala125 IL-2, des-ala1 des-pro2 des-thr3 val104 ser125 IL-2, des-ala1 des-pro2 des thr3 val104 IL-2, des-ala1 des-pro2 desthr3 val104 ala125 IL-2, des-ala1 des-pro2 des-thr3 des-ser4 ala104 ser125 IL-2, des-ala1 des-pro2 des-thr3 des-ser4 ala104 IL-2, des-ala1 des-pro2 des-thr3 des-ser4 ala104 ala125 IL-2, des-ala1 des-pro2 des-thr3 des-ser4 val104 ser125 IL-2, des-ala1 des-pro2 des-thr3 des-ser4 val104 IL-2, des-ala1 des-pro2 des-thr3 des-ser4 val104 ala125 IL-2, des-ala1 des-pro2 des-thr3 des-ser4 des-ser5 ala104 ser125 IL-2, des-ala1 des-pro2 des-thr3 des-ser4 des-ser5 ala104 IL-2, des-ala1 des-pro2 des-thr3 des-ser4 des-ser5 ala104 ala125 IL-2, des-ala1 des-pro2 des-thr3 des-ser4 des-ser5 val104 ser125 IL-2, des-ala1 des-pro2 des-thr3 des-ser4 des-ser5 val 104 IL-2, des-ala1 des-pro2 des-thr3 des-ser4 des-ser5 val104 ala125 IL-2, des-ala1 des-pro2 des-thr3 des-ser4 des-ser5 des-ser6 ala104 ala125 IL-2, des-ala1 des-pro2 des-thr3 des-ser4 des-ser5 des-ser6 ala104 IL-2, des-ala1 des-pro2 des-thr3 des-ser4 des-ser5 des-ser6 ala104 ser125 IL-2, des-ala1 des-pro2 des-thr3 des-ser4 des-ser5 des-ser6 val104 ser125 IL-2, des-ala1 des-pro2 des-thr3 des ser4 des-ser5 des-ser6 val104 IL-2 y des-ala1 des-pro2 des-thr3 des-ser4 des-ser5 des-ser6 val104 ala125 IL2) y la patente de EE.UU. n° 4.931,543 (que divulga la muteína de IL-2 des-alanil-2, serina-125 IL-2 humana usada en los ejemplos del presente documento, así como las demás muteínas de IL-2).

Véase también la publicación de patente europea n° EP 200.280 (publicada el 10 de diciembre de 1986), que divulga muteínas de IL-2 recombinantes en las que la metionina en la posición 104 se ha sustituido por un aminoácido conservador. Ejemplos incluyen las muteínas siguientes: ser4 des-ser5 ala104 IL-2; des-ala1 des-pro2 des-thr3 des-ser4 des-ser5 ala104 ala125 IL-2; des-ala1 des-pro2 des-thr3 des-ser4 des-ser5 glu104 ser125 IL-2; des-ala1 des-pro2 des-thr3 des-ser4 des-ser5 glu104 IL-2; des-ala1 des-pro2 des-thr3 des-ser4 des-ser5 glu 104 ala125 IL-2; des-ala1 des-pro2 des-thr3 des-ser4 des-ser5 des-ser6 ala104 ala125 IL-2; des-ala1 des-pro2 des-thr3 des-ser4 des-ser5 des-ser6 ala104 IL-2; des-ala1 des-pro2 des-thr3 des-ser4 des-ser5 des-ser6 ala104 ser125 IL-2; des-ala1 des-pro2 des-thr3 des-ser4 des-ser5 des-ser6 glu104 ser125 IL-2; des-ala1 des-pro2 des-thr3 des-ser4 des-ser5 des-ser6 glu104 IL-2; y des-ala1 des-pro2 des-thr3 des-ser4 des-ser5 des-ser6 glu104 ala125 IL-2. Véase también la publicación de patente europea n° EP 118.617 y la patente de EE.UU. n° 5.700.913, que divulgan variantes de IL-2 humana no glicosilada que llevan alanina en lugar de la metionina de la IL-2 nativa como aminoácido N terminal; una IL-2 humana no glicosilada con la metionina inicial eliminada de modo que la prolina está en el aminoácido N-terminal; y una IL-2 humana no glicosilada con una alanina insertada entre los aminoácidos metionina y prolina en N terminal.

Otras muteínas de IL-2 incluyen las divulgadas en el documento WO 99/60128 (sustituciones del aspartato en la posición 20 con histidina o isoleucina, la asparagina en la posición 88 con arginina, glicina o isoleucina, o la glutamina en la posición 126 con leucina o ácido glutámico), que se ha notificado que tienen actividad selectiva por los receptores de alta afinidad de la IL-2 expresados por las células que expresan los receptores de células T en preferencia a las células NK y toxicidad reducida a la IL-2; las muteínas divulgadas en la patente de EE.UU. n° 5.229.109 (sustituciones de arginina en la posición 38 con alanina, o sustituciones de fenilalanina en la posición 42 con lisina), que exhiben menor unión al receptor de IL-2 de alta afinidad cuando se compara con la IL-2 nativa mientras mantienen la capacidad para estimular las células LAK; las muteínas divulgadas en la publicación internacional n° WO 00/58456 (que alteran o eliminan una secuencia (x)D(y) naturales en la IL-2 nativa, en la que D es ácido aspártico, (x) es leucina, isoleucina, glicina o valina, e (y) es valina, leucina o serina), que se ha reivindicado que reducen el síndrome de fuga vascular; el péptido p1-30 de IL-2 divulgado en la publicación internacional n° WO 00/04048 (correspondiente a los primeros 30 aminoácidos de IL-2, que contiene toda la hélice A-a de la IL-2 e interacciona con la cadena b del receptor de IL-2), que se ha comunicado que estimula las células NK y la inducción de las células LAK; y una forma mutante del péptido p1-30 de IL-2 también divulgado en el documento WO 00/04048 (sustitución de ácido aspártico en la posición 20 con lisina), que se ha notificado que es incapaz de inducir sangrados vasculares pero permanece capaz de generar células LAK. Adicionalmente, la IL-2 se puede modificar con polietilenglicol para proporcionar una solubilidad potenciada y un perfil farmacocinético alterado (véase las patentes de EE.UU. n° 4.766.106).

Otras muteínas de la IL-2 presentan perfiles funcionales mejorados predicativos de toxicidades reducidas. Las muteínas inducen un menor nivel de producción de citocinas proinflamatorias por las células NK, mientras mantienen o aumentan la proliferación de células NK, mantienen las funciones citolíticas NK, LAK y ADCC mediadas por células NK y mantienen la función proliferativa de las células T en comparación con la IL-2 humana des-alanil-2, C125S o las muteínas de IL-2 humana C125S. Ejemplos de estas muteínas de IL-2 mejoradas incluyen, entre otros, T7A, L36G, P65E, R81L, T7D, L36H, P65F, R81M, T7R, L36I, P65G, R81N, K8L, L36K, P65H, R81P, K9A, L36M, P65I, R81T, K9D, L36N, P65K, D84R, K9R, L36P, P65L, S87T, K9S, L36R, P65N, N88D, K9V, L36S, P65Q, N88H, K9W, L36W, P65R, N88T, T10K, L36Y, P65S, V91A, T10N R38D, P65T, V91D, Q11A, R38G, P65V, V91E, Q11R, R38N, P65W, V91F, Q11T, R38P, P65Y, V91G, E15A, R38S, L66A, V91Q, H16D, L40D, L66F, V91W, H16E, L40G, E67A, V91N, L19D, L40N, L72G, L94A, L19E, L40S, L72N, L94I, D20E, T41E, L72T, L94T, I24L, T41G, F78S, L94V, K32A, F42A, F78W, L94Y, K32W, F42E, H79F, E95D, N33E, F42R, H79M, E95G, P34E, F42T, H79N, E95M, P34R, F42V, H79P, T102S, P34S, K43H, H79Q, T102V, P34T, F44K, H79S, M104G, P34V, M46I, H79V, E106K, K35D, E61K, L80E, Y107H, K35I, E61M, L80F, Y107K, K35L, E61R, L80G, Y107L, K35M, E62T, L80K, Y107Q, K35N, E62Y, L80N, Y107R, K35P, K64D, L80R, Y107T, K35Q, K64E, L80T, E116G, K35T, K64G, L80V, N119Q, L36A, K64L, L80W, T123S, L36D, K64Q, L80Y, T123C, L36E, K64R, R81E, Q126I, L36F, P65D, R81K y Q126V, en los que la posición del residuo es relativa a la posición dentro de la secuencia de IL-2 humana madura expuesta en la SEC ID N° 16. Ejemplos de estas muteínas de IL-2 combinatorias incluyen, entre otros, 19D40D, 19D81K, 36D42R, 36D61R, 36D65L, 40D36D, 40D61R, 40D65Y, 40D72N, 40D80K, 40G36D, 40G65Y, 80K36D, 80K65Y, 81K36D, 81K42E, 81K61R, 81K65Y, 81K72N, 81K88D, 81K91D, 81K107H, 81L107H, 91N95G,

107H36D, 107H42E, 107H65Y, 107R36D, 107R72N, 40D81K107H, 40G81K107H y 91N94Y95G, en los que la posición del residuo es relativa a la posición dentro de la secuencia de IL-2 humana madura expuesta en la SEC ID N° 16.

El término IL-2 como se usa en el presente documento también se entiende que incluye las fusiones o conjugados de IL-2 que comprenden IL-2 fusionada con una segunda proteína o conjugada covalentemente con poliprolina o un polímero hidrosoluble para reducir las frecuencias de la dosificación o para mejorar la tolerabilidad de la IL-2. Por ejemplo, la IL-2 (o una variante del mismo como se define en el presente documento) se puede fusionar con albúmina humana o un fragmento de albúmina usando procedimientos conocidos en la técnica (véase el documento WO 01/79258). Como alternativa, la IL-2 se puede conjugar de forma covalente con homopolímeros de poliprolina o de polietilenglicol y polioles polioxiethylados, en los que el homopolímero está insustituido o sustituido en un extremo con un grupo alquilo y el poliol está insustituido, usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 4.766.106, 5.206.344 y 4.894.226).

Formulaciones farmacéuticas de IL-2 o una variante de la misma

Cualquier composición farmacéutica que comprenda IL-2 o una variante biológicamente activa de la misma como el componente terapéuticamente activo puede usarse en los procedimientos dados a conocer en el presente documento. Dichas composiciones farmacéuticas se conocen en la técnica e incluyen, entre otras, las descritas en las patentes de EE.UU. n° 4.604.377; 4.745.180; 4.766.106; 4.816.440; 4.894.226; 4.931.544; 4.992.271; 5.078.997; y 6.525.102. Por consiguiente, las composiciones líquidas, liofilizadas o secadas por pulverización que comprenden IL-2 o variantes de la misma que se conocen en la técnica pueden prepararse como una disolución o suspensión acuosa o no acuosa para la posterior administración a un sujeto de acuerdo con los procedimientos dados a conocer en el presente documento. Cada una de estas composiciones comprenderá IL-2 o variantes de la misma como un componente terapéuticamente o profilácticamente activo. Por "componente terapéuticamente o profilácticamente activo" se entiende que la IL-2 o variantes de la misma específicamente incorporada en la composición para provocar una respuesta terapéutica o profiláctica con respecto al tratamiento, la prevención o el diagnóstico de una enfermedad o afección en un sujeto cuando se administra la composición farmacéutica a ese sujeto. De preferencia, las composiciones farmacéuticas comprenden agentes estabilizantes, agentes de carga adecuados, o ambos para reducir al mínimo los problemas asociados con la pérdida de estabilidad y actividad biológica de las proteínas durante la preparación y el almacenamiento.

Por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 4.604.377 muestra una formulación de IL-2 que tiene una cantidad terapéutica de IL-2, que está sustancialmente exenta de proteína no IL-2 y endotoxina, un transportador hidrosoluble fisiológicamente aceptable y una cantidad suficiente de un agente de superficie activa para solubilizar la IL-2, como dodecilsulfato sódico. Otros ingredientes pueden incluirse, como azúcares. La patente de EE.UU. N° 4.766.106 muestra formulaciones que incluyen IL-2 modificada con polietilenglicol (PEG). La solicitud de patente europea, publicación n° 268.110 muestra IL-2 formulada con diversos tensioactivos no iónicos seleccionados del grupo constituido por ésteres de ácidos grasos polioxiethylensorbitano (Tween-80), monoestearato de polietilenglicol y compuestos de octilfenoxi polietoxietanol (Triton X405). La patente de EE.UU. n° 4.992.271 divulga formulaciones de IL-2 que comprenden seroalbúmina humana y la patente de EE.UU. n° 5.078.997 divulga formulaciones de IL-2 que comprenden seroalbúmina humana y aminoácidos. La patente de EE.UU. n° 6.525.102 divulga formulaciones de IL-2 que comprenden una base de aminoácido, que sirve como el principal agente estabilizante del polipéptido y un ácido y/o su forma de sal para tamponar la solución dentro de un intervalo de pH aceptable para la estabilidad del polipéptido. El documento US 2003/0198602 divulga formulaciones de IL-2 adecuadas para administración pulmonar.

Anticuerpos anti CD40 antagonistas y variantes adecuados de los mismos

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

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

codificadora para la cadena ligera para el mAb CHIR-12.12) y SEC ID N° 3 (secuencia codificadora para la cadena pesada para el mAb CHIR-12.12). Las secuencias de aminoácidos para las regiones líder, variable y constante para la cadena ligera y cadena pesada del mAb CHIR-5.9 se presentan en las Figuras 10A y 10B, respectivamente. Véase también SEC ID N° 6 (secuencia completa para la cadena ligera del mAb CHIR-5.9), SEC ID N° 7 (secuencia completa para la cadena pesada del mAb CHIR-5.9) y SEC ID N° 8 (secuencia completa para una variante de la cadena pesada del mAb CHIR-5.9 presentada en SEC ID N° 7, donde la variante comprende una sustitución del residuo alanina por serina en la posición de 158 de SEC ID N° 7). Además, los híbridos que expresan los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 se han depositado en la ATCC con una denominación de depósito de patente de PTA-5542 y PTA-5543, respectivamente.

Además de la actividad antagonista, los anticuerpos anti CD40 pueden tener otro mecanismo de acción contra una célula tumoral. Por ejemplo, los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 nativos tienen actividad ADCC. Como alternativa, las regiones variables de los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 pueden expresarse en otro isotipo de anticuerpos que tenga actividad ADCC. También es posible conjugar formas nativas, formas recombinantes o fragmentos de unión a antígeno de CHIR-5.9 o CHIR-12.12 a una citotoxina, un agente terapéutico o a un ion radioisótopo.

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

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

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

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

Por "actividad agonista" se entiende que la sustancia funciona como un agonista. Un agonista se combina con un receptor en una célula e inicia una reacción o actividad que es similar a la misma que se inicia por el ligando natural del receptor. Un agonista de CD40 induce, pero no se limita a, cualquiera o todas las siguientes respuestas: proliferación y diferenciación de células B, producción de anticuerpos, adhesión intercelular, generación de memoria de células

B, cambio de isotipo, regulación ascendente de la expresión en la superficie celular de MHC clase II y CD80/86, y secreción de citocinas proinflamatorias tales como IL-8, IL-12 y TNF. Por "actividad antagonista" se entiende que la sustancia funciona como un antagonista. Un antagonista de CD40 evita o reduce la inducción de cualquiera de las respuestas inducidas por la unión del receptor de CD40 a un ligando agonista, en particular CD40L. El antagonista puede reducir la inducción de una o más de las respuestas a la unión de agonistas en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, de preferencia 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, de más preferencia 70%, 80%, 85% y de mayor preferencia 90%, 95%, 99% ó 100%. Los procedimientos para medir la especificidad de unión y la actividad de antagonista de anticuerpos anti CD40 y ligandos de CD40 son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, ensayos de unión competitiva convencionales, ensayos para controlar la secreción de inmunoglobulinas por las células B, ensayos de proliferación de células B, ensayos de proliferación de células B análogos a Banchereau, ensayos de células T ayudantes para la producción de anticuerpos, ensayos de proliferación de células B con coestimulación y ensayos para regulación ascendente de marcadores de activación de células B. Véase, por ejemplo, los ensayos dados a conocer en el documento WO 00/75348 y en la Patente de EEUU N° 6.087.329.

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

Los anticuerpos monoclonales contra CD40 son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, las secciones dedicadas a antígenos de células B en McMichael, ed. (1987; 1989). *Leukocyte Typing III and IV* (Oxford University Press, Nueva York); Patentes de EEUU N° 5.674.492; 5.874.082; 5.677.165; 6.056.959; documento WO 00/63395; documentos de Publicación Internacional N° WO 02/28905 y WO 02/28904; Gordon y col. (1988) *J. Immunol.* 140: 1425; Valle y col. (1989) *Eur. J. Immunol.* 19: 1463; Clark y col. (1986) *PNAS* 83: 4494; Paulie y col. (1989) *J. Immunol.* 142: 590; Gordon y col. (1987) *Eur. J. Immunol.* 17: 1535; Jabara y col. (1990) *J. Exp. Med.* 172: 1861; Zhang y col. (1991) *J. Immunol.* 146: 1836; Gascan y col. (1991) *J. Immunol.* 147: 8; Banchereau y col. (1991) *Clin. Immunol. Spectrum* 3: 8; y Banchereau y col. (1991) *Science* 251: 70. Son de particular interés para la presente invención los anticuerpos anti CD40 antagonistas dados a conocer en el presente documento que comparten las características de unión de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos anteriormente. Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: (1) los anticuerpos monoclonales producidos por las líneas celulares de hibridoma denominadas 131.2F8.5.9 (a la que se hace referencia en el presente documento como línea celular 5.9) y 153.8E2.D10.D6.12.12 (a la que se hace referencia en el presente documento como línea celular 12.12), depositadas en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 y Depósito de Patente N° PTA-5543, respectivamente; (2) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia mostrada en SEC ID N° 2, la secuencia mostrada en SEC ID N° 4, la secuencia mostrada en SEC ID N° 5, las secuencias mostradas en SEC ID N° 2 y SEC ID N° 4, y por las secuencias mostradas en SEC ID N° 2 y SEC ID N° 5; (3) un anticuerpo monoclonal que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia mostrada en SEC ID N° 6, la secuencia mostrada en SEC ID N° 7, la secuencia mostrada en SEC ID N° 8, las secuencias mostradas en SEC ID N° 6 y SEC ID N° 7, y por las secuencias mostradas en SEC ID N° 6 y SEC ID N° 8; (4) un anticuerpo monoclonal que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID N° 1, la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID N° 3, y las secuencias de nucleótidos mostradas en SEC ID N° 1 y SEC ID N° 3; (5) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 5.9 o la línea celular de hibridoma 12.12; (6) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 10 o SEC ID N° 12; (7) un anticuerpo monoclonal que compete con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitiva; y (8) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 que se une al antígeno o los anticuerpos monoclonales anteriores en los puntos anteriores (1)-(7), en los que el fragmento retiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno CD40 humano.

Producción de anticuerpos anti CD40 antagonistas

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

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

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

De preferencia el anticuerpo es monoclonal en la naturaleza. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico, es decir, el antígeno CD40 de superficie celular. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo ya que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que es necesaria la producción del anticuerpo por ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilizan según la presente invención pueden obtenerse por el procedimiento de hibridomas descrito por primera vez por Kohler y col. (1975) Nature 256: 495, o pueden producirse por los procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Patente de EEUU N° 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" pueden aislarse también de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson y col. (1991) Nature 352: 624-628; Marks y col. (1991) J Mol. Biol. 222: 581-597; y en la Patente de EEUU N° 5.514.548.

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

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

Cuando los anticuerpos anti CD40 antagonistas de la invención deben prepararse utilizando procedimientos de ADN recombinante, el ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma

descritas en el presente documento sirven como una fuente de preferencia de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en las células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otra manera proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Los artículos de recopilación sobre expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra y col. (1993) Curr. Opin. Immunol. 5: 256 y Phickthun (1992) Immunol. Revs. 130: 151. Como alternativa, puede producirse anticuerpo en una línea celular tal como una línea celular CHO, como se da a conocer en las Patentes de EEUU N° 5.545.403; 5.545.405; y 5.998.144. En resumen, la línea celular se transfecta con vectores capaces de expresar una cadena ligera y una cadena pesada, respectivamente. Transfectando las dos proteínas en vectores separados, pueden producirse anticuerpos quiméricos. Otra ventaja es la glicosilación correcta del anticuerpo.

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

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

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

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

La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col. (1986) Nature 321: 522-525; Riechmann y col. (1988) Nature 332: 323-327; Verhoeyen y col. (1988) Science 239: 1534-1536), sustituyendo secuencias de un anticuerpo humano por las correspondientes CDR o secuencias CDR de roedores o roedores mutantes. Véase también las Patentes de EEUU N° 5.225.539; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.859.205. En algunos casos, los residuos dentro de las regiones marco de una o más regiones variables de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes residuos no humanos (véase, por ejemplo, las Patentes de EEUU N° 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; y 6.180.370). Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se realizan para refinar más el rendimiento del anticuerpo (por ejemplo, para obtener la afinidad deseada). En general,

en anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en el que todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones y col. (1986) *Nature* 331: 522-525; Riechmann y col. (1988) *Nature* 332: 323-329; y Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" pueden incluir anticuerpos en los que sustancialmente menos de un dominio variable intacto humano se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos del marco están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores. Véase, por ejemplo, las Patentes de EEUU N° 5.225.539; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.859.205. Véase también la Patente de EEUU N° 6.180.370, y el documento de Publicación Internacional WO 01/27160, en los que se dan a conocer anticuerpos humanizados y técnicas para producir anticuerpos humanizados que tienen mejor afinidad para un antígeno predeterminado.

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

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

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

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos generadas usando las técnicas descritas en, por ejemplo, McCafferty y col. (1990) *Nature* 348: 552-554 (1990) y en la Patente de EEUU N° 5.514.548. Clackson y col. (1991) *Nature* 352: 624-628 y Marks y col. (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (del orden de nM) por mezcla aleatoria de cadenas (Marks y col. (1992) *Biol/Technology* 10:779-783), así como por infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse y col. (1993) *Nucleic Acids Res.* 21: 2265-2266). Por consiguiente, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridomas de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

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

Los anticuerpos anti CD40 antagonistas útiles en los procedimientos de la presente invención incluyen los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR 12.12 dados a conocer en el presente documento así como los anticuerpos que difieren de estos anticuerpos pero que retienen las CDR; y los anticuerpos con una o más adiciones, delecciones o

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

Los anticuerpos útiles en la práctica de los procedimientos descritos en el presente documento pueden tener variaciones de secuencia producidas usando los procedimientos descritos en, por ejemplo, los documentos de Publicación de Patente N° EP 0 983 303 A1, WO 00/34317 y WO 98/52976.

Por ejemplo, se ha mostrado que las secuencias dentro de la CDR pueden provocar que un anticuerpo se una a MAC Clase II y desencadenar una respuesta de células T colaboradoras no deseada. Una sustitución conservadora puede permitir que el anticuerpo retenga la actividad de unión y aún pierda su capacidad para desencadenar una respuesta de células T no deseada. Cualquiera de tales sustituciones conservadoras o no conservadoras puede realizarse usando procedimientos reconocidos en la técnica, tales como los señalados en otra parte en el presente documento, y los anticuerpos resultantes se encontrarán dentro del alcance de la invención. Los anticuerpos variantes pueden probarse de manera rutinaria para verificar su actividad antagonista, afinidad y especificidad usando los procedimientos descritos en el presente documento.

Un anticuerpo producido por cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, o cualquier otro procedimiento no dado a conocer en el presente documento, se encontrará dentro del alcance de esta descripción si posee al menos una de las siguientes actividades biológicas: inhibición de la secreción de inmunoglobulinas por las células B periféricas humanas normales estimuladas por células T; inhibición de la supervivencia y/o proliferación de células B periféricas humanas normales estimuladas por células T Jurkat; inhibición de la proliferación de células B periféricas humanas normales estimuladas por células que expresan CD40L o ligando de CD40 soluble; e inhibición de la proliferación de células B neoplásicas humanas como se señala a continuación.

Véase también los ensayos descritos en Schultze y col. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8200-8204; Denton y col. (1998) Pediatr. transplant. 2: 6-15; Evans y col. (2000) J. Immunol. 164: 688-697; Noelle (1998) Agents Actions Suppl. 49: 17-22; Lederman y col. (1996) Curr. Opin. Hematol. 3: 77-86; Coligan y col. (1991) Current Protocols in Immunology 13: 12; Kwekkeboom y col. (1993) Immunology 79: 439-444; y Patentes de EEUU N° 5.674.492 y 5.847.082.

Un ensayo representativo para detectar anticuerpos anti CD40 antagonistas específicos para los epítomos del antígeno CD40 identificado en el presente documento es un "ensayo de unión competitiva". Los ensayos de unión competitiva son ensayos serológicos en los que el desconocido se detecta y cuantifica por su capacidad para inhibir la unión de un ligando conocido marcado a su anticuerpo específico. Esto también se conoce como un ensayo de inhibición competitiva. En un ensayo de unión competitiva representativo, se precipita el polipéptido CD40 marcado por medio de anticuerpos candidato en una muestra, por ejemplo, en combinación con anticuerpos monoclonales surgidos contra uno o más epítomos de los anticuerpos monoclonales de la invención. Los anticuerpos anti CD40 que reaccionan específicamente con un epítomo de interés pueden identificarse seleccionando una serie de anticuerpos preparados contra una proteína CD40 o fragmento de la proteína que comprende el epítomo particular de la proteína CD40 de interés. Por ejemplo, para CD40 humano, los epítomos de interés incluyen epítomos que comprenden residuos de aminoácido lineales o no lineales de la isoforma corta del CD40 humano (véase GenBank N° de acceso NP 690593) presentada en la Figura 12 (SEC ID N° 10), codificada por la secuencia presentada en la Figura 12A (SEC ID N° 9; véase también GenBank N° de acceso M 152854), o de la isoforma larga de CD40 humano (véase GenBank N° de acceso CAA43045 y NP 001241) presentada en la Figura 12D (SEC ID N° 12), codificada por la secuencia presentada en la Figura 12C (SEC ID N° 11; véase GenBank N° de acceso X60592 y MN 001250). Como alternativa, podrían usarse ensayos de unión competitiva con anticuerpos anti CD40 antagonistas adecuados identificados anteriormente para seleccionar los anticuerpos monoclonales comparables a los anticuerpos identificados anteriormente.

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

Los marcadores adecuados incluyen fluoróforos, cromóforos, átomos radiactivos (especialmente ³²P y ¹²⁵I), reactivos densos a electrones, enzimas y ligandos que tienen parejas de unión específicas. Las enzimas se detectan normalmente por su actividad. Por ejemplo, la peroxidasa del rábano picante se detecta usualmente mediante su capa-

ciudad para convertir 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) en un pigmento azul, cuantificable con un espectrofotómetro. "Pareja de unión específica" se refiere a una proteína capaz de unirse a una molécula de ligando con alta especificidad, como por ejemplo en el caso de un antígeno y un anticuerpo monoclonal específico para éste. Otras parejas de unión específica incluyen biotina y avidina o estreptavidina, IgG y proteína A, y las numerosas parejas de receptor-ligando conocidas en la técnica. Debería entenderse que la descripción anterior no pretende categorizar los diversos marcadores en diferentes clases, ya que el mismo marcador puede servir en varios modos diferentes. Por ejemplo, ¹²⁵I puede servir como un marcador radioactivo o como un reactivo denso en electrones. HRP puede servir como enzima o como antígeno para un mAb. Además, pueden combinarse diversos marcadores para el efecto deseado. Por ejemplo, los mAb y la avidina también requieren marcadores en la práctica de esta invención: por consiguiente, puede marcarse un mAb con biotina, y detectarse su presencia con avidina marcada con ¹²⁵I, o con un mAb anti-biotina marcado con HRP. Otras permutaciones y posibilidades serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica, y se consideran como equivalentes dentro del alcance de la presente invención.

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

Además, un anticuerpo (o su fragmento) puede conjugarse a un resto terapéutico como una citotoxina, un agente terapéutico, iones metálicos radiactivos o radioisótopos. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células. Algunos ejemplos incluyen taxol, citochalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puomicina, y sus análogos y homólogos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tieopa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Los radioisótopos incluyen, pero no se limitan a, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, Bi-213, Pd-109, Tc-99, In-111 y similares. Los conjugados de la invención pueden utilizarse para modificar una respuesta biológica determinada; no debe entenderse que el resto del fármaco esté limitado a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto del fármaco puede ser una proteína o un polipéptido que tenga una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina de difteria; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, interferón alfa, interferón beta, factor de crecimiento de los nervios, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, activador tisular del plasminógeno, o, modificadores de respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina 1 ("IL-1"), interleucina 2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulador de colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

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

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

Variantes biológicamente activas de anticuerpos anti CD40 antagonistas

Las composiciones farmacéuticas útiles en los procedimientos descritos en el presente documento pueden comprender variantes biológicamente activas de los anticuerpos anti CD40 antagonistas de la invención. Dichas variantes retendrán la actividad biológica deseada del polipéptido nativo de modo que la composición farmacéutica que comprende el polipéptido variante tiene el mismo efecto terapéutico que la composición farmacéutica que comprende el polipéptido nativo, cuando se administra a un sujeto. Es decir, el anticuerpo anti CD40 variante servirá como com-

ponente terapéuticamente eficaz en la composición farmacéutica de un modo similar al observado para el anticuerpo antagonista nativo, por ejemplo CHIR-5.9 o CHIR-12.12 expresados por la línea celular de hibridoma 5.9 o 12.12, respectivamente. En la técnica se dispone de procedimientos para determinar si una variante de anticuerpo anti CD40 conserva la actividad biológica deseada y, por tanto, sirve como componente terapéuticamente activo en la composición farmacéutica. La actividad biológica de las variantes de los anticuerpos se pueden medir usando ensayos diseñados específicamente para medir la actividad del antagonista nativo, incluidos ensayos descritos en el presente documento. Variantes adecuadas biológicamente activas de los anticuerpos anti CD40 antagonistas conservarán las propiedades de unión deseadas del anticuerpo parental, es decir el anticuerpo anti CD40 antagonista parental. Por lo general, en la técnica están disponibles procedimientos para producir variantes de anticuerpos.

Por ejemplo, pueden prepararse variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 descritos en el presente documento, por medio de mutaciones en la secuencia de ADN clonada que codifica el anticuerpo de interés. Los procedimientos para mutagénesis y alteraciones de secuencias de nucleótidos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Walker and Gastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, Nueva York); Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488-492; Kunkel y col. (1987) *Methods Enzymol.* 154: 367-382; Sambrook y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, Nueva York); Patente de EEUU N° 4.873.192; y las referencias citadas en la misma.

En el modelo de Dayhoff y col. (1978) en *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.) puede encontrarse orientación para sustituciones adecuadas de aminoácidos que no afectan la actividad biológica del polipéptido de interés. Las sustituciones conservadoras, tales como los intercambios de un aminoácido con otro que tiene propiedades similares, pueden ser de preferencia. Los ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen, pero no se limitan a, Gly $\leftrightarrow$ Ala, Val $\leftrightarrow$ Ile $\leftrightarrow$ Leu, Asp $\leftrightarrow$ Glu, Lys $\leftrightarrow$ Arg, Asn $\leftrightarrow$ Gln y Phe $\leftrightarrow$ Trp $\leftrightarrow$ Tyr.

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

De preferencia, las variantes de un anticuerpo anti CD40 antagonista de referencia tienen secuencias de aminoácidos que tienen al menos 70% o 75% de homología de secuencia, de preferencia al menos 80% u 85% de homología de secuencia, de más preferencia al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94% ó 95% de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos para la molécula del anticuerpo anti CD40 antagonista de referencia, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 descritos en el presente documento, o con una parte más corta de una molécula de anticuerpo de referencia. De más preferencia, las moléculas comparten al menos 96%, 97%, 98% ó 99% de homología de secuencia.

Para los fines de la presente invención, el porcentaje de homología de secuencia se determina usando el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda de huecos afines con parámetros de penalización de hueco abierto de 12 y penalización de extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se enseña en Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489. Una variante puede, por ejemplo, diferir del anticuerpo anti CD40 antagonista de referencia en tan pocos como 1 a 15 residuos de aminoácidos, tan pocos como 1 a 10 residuos de aminoácidos, tal como 6-10, tan pocos como 5, tan pocos como 4, 3, 2, o incluso 1 residuo de aminoácido.

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

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

actividad, ya sea aumentando o disminuyendo la actividad del polipéptido, en los diversos ensayos. Además, pueden modificarse residuos de aminoácidos individuales en la cadena por oxidación, reducción u otra derivatización, y el polipéptido puede escindirse para obtener fragmentos que retengan la actividad. Tales alteraciones que no destruyen la actividad antagonista no retiran a la secuencia del polipéptido de la definición de anticuerpos anti CD40 de interés según se utiliza en el presente documento.

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

Formulaciones farmacéuticas de los anticuerpos anti CD40 antagonistas

Los anticuerpos anti CD40 antagonistas de esta invención se administran en una concentración que es terapéuticamente eficaz para prevenir o tratar la leucemia linfocítica crónica. Para lograr este objetivo, los anticuerpos pueden formularse usando una diversidad de excipientes aceptables conocidos en la técnica. Típicamente, los anticuerpos se administran por medio de inyección, ya sea por vía intravenosa, por vía intraperitoneal o por vía subcutánea. Los procedimientos para llevar a cabo esta administración son conocidos por los expertos en la técnica. También puede ser posible obtener composiciones que puedan administrarse por vía tópica o por vía oral, o que pueden ser capaces de transmitirse a través de membranas mucosas.

Una composición farmacéutica descrita en el presente documento está formulada para que sea compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de posibles vías de administración incluyen la administración parenteral (por ejemplo, intravenosa (IV), intramuscular (IM), intradérmica, subcutánea (SC), o infusión), oral y pulmonar (por ejemplo, inhalación), nasal, transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Las soluciones o suspensiones usadas para aplicaciones parenterales, intradérmicas o subcutáneas pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para ajustar la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples fabricados de vidrio o de plástico.

Los anticuerpos se proporcionan típicamente por medio de técnicas convencionales en un tampón farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, disolución salina estéril, agua tamponada estéril, propilenglicol, combinaciones de los anteriores, etc. El anticuerpo anti CD40 antagonista (o su fragmento de unión a antígeno) se puede formular en composiciones farmacéuticas separadas o se puede formular en una única composición farmacéutica con IL-2, o una variante biológicamente activa de la misma, para administración simultánea. En Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990) se describen procedimientos para preparar agentes que pueden administrarse por vía parenteral. Véase también, por ejemplo, el documento WO 98/56418, que describe formulaciones farmacéuticas de anticuerpos estabilizadas adecuadas para usar en los procedimientos descritos en el presente documento.

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

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

Pueden añadirse compuestos de formulación a las composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti CD40 antagonista de la invención o su fragmento de unión a antígeno. Estos compuestos de formulación pueden

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

Además, los anticuerpos pueden modificarse químicamente por conjugación covalente con un polímero para, por ejemplo, aumentar su semivida en circulación. Los polímeros de preferencia y los procedimientos para ligarlos a péptidos se muestran en las Patentes de EEUU N° 4.766.106; 4.179.337; 4.495.285; y 4.609.546. Los polímeros de preferencia son polioles polioxietilados y polietilenglicol (PEG). El PEG es soluble en agua a temperatura ambiente y tiene la fórmula general: $R(O-CH_2-CH_2)_n O-R$, en la que R puede ser hidrógeno, o un grupo protector tal como un grupo alquilo o alanol. De preferencia, el grupo protector tiene entre 1 y 8 carbonos, de más preferencia es metilo. El símbolo n es un número entero positivo, de preferencia entre 1 y 1.000, de más preferencia entre 2 y 500. El PEG tiene un peso molecular promedio preferido entre 1.000 y 40.000, de más preferencia entre 2.000 y 20.000, de mayor preferencia entre 3.000 y 12.000. De preferencia, el PEG tiene al menos un grupo hidroxilo, de más preferencia es un grupo hidroxilo terminal. Este es el grupo hidroxilo que se activa de preferencia para reaccionar con un grupo amino libre sobre el inhibidor. Sin embargo, se entenderá que el tipo y la cantidad de los grupos reactivos pueden variarse para obtener un PEG/anticuerpo de la presente invención conjugado de manera covalente.

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

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

Los compuestos de formulación a incorporar en una composición farmacéutica deberían proporcionar estabilidad del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno. Es decir, el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno deberá retener su estabilidad física y/o química y deberá tener la actividad biológica deseada, es decir, una o más de las actividades antagonistas definidas anteriormente en el presente documento, incluidas, entre otras, inhibición de la secreción de inmunoglobulinas por las células B periféricas humanas normales estimuladas por células T; inhibición de la supervivencia y/o proliferación de las células B periféricas humanas normales estimuladas por células T de Jurkat; inhibición de la supervivencia y/o proliferación de las células B periféricas humanas normales estimuladas por células que expresan CD40L o ligando de CD40 soluble (sCD40L); inhibición de señales intracelulares antiapoptóticas de "supervivencia" en cualquier célula estimulada por el sCD40L o el CD40L de fase sólida; inhibición de la transducción de señal de CD40 en cualquier célula tras la unión con el sCD40L o el CD40L de fase sólida; e inhibición de la proliferación de células B humanas malignas como se señaló en otra parte en el presente documento.

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

Una proteína tal como un anticuerpo, cuando se formula en una composición farmacéutica, se considera que mantiene su estabilidad física en un momento dado si no muestra signos visuales (es decir, decoloración o pérdida de transparencia) o signos que pueden medirse (por ejemplo, usando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) o dis-

persión de luz UV) de precipitación, agregación, y/o desnaturalización en esa composición farmacéutica. Con respecto a la estabilidad química, una proteína tal como un anticuerpo, cuando se formula en una composición farmacéutica, se considera que mantiene su estabilidad química en un momento dado si las medidas de estabilidad química son indicativas de que la proteína (es decir, el anticuerpo) mantiene su actividad biológica de interés en esa composición farmacéutica. Los procedimientos para controlar los cambios en la estabilidad química son bien conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, procedimientos para detectar formas químicamente alteradas de la proteína tales como el resultado de la degradación, usando, por ejemplo, SDS-PAGE, SEC, y/o espectrometría de masas por tiempo de vuelo de desorción/ionización de láser asistida por matriz; y degradación asociada con cambios en la carga molecular (por ejemplo, asociada con desamidación), usando, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico. Véase, por ejemplo, los procedimientos que se dan a conocer en el presente documento a continuación.

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

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

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

De esta manera, la composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 50,0 mg/ml, aproximadamente 0,5 mg/ml hasta aproximadamente 40,0 mg/ml, aproximadamente 1,0 mg/ml hasta aproximadamente 30,0 mg/ml, aproximadamente 5,0 mg/ml hasta aproximadamente 25,0 mg/ml, aproximadamente 5,0 mg/ml hasta aproximadamente 20,0 mg/ml, o aproximadamente 15,0 mg/ml hasta aproximadamente 25,0 mg/ml. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 5,0 mg/ml, aproximadamente 5,0 mg/ml hasta aproximadamente 10,0 mg/ml, aproximadamente 10,0 mg/ml hasta aproximadamente 15,0 mg/ml, aproximadamente 15,0 mg/ml hasta aproximadamente 20,0 mg/ml, aproximadamente 20,0 mg/ml hasta aproximadamente 25,0 mg/ml, aproximadamente 25,0 mg/ml hasta aproximadamente 30,0 mg/ml, aproximadamente 30,0 mg/ml hasta aproximadamente 35,0 mg/ml, aproximadamente 35,0 mg/ml hasta aproximadamente 40,0 mg/ml, aproximadamente 40,0 mg/ml hasta aproximadamente 45,0 mg/ml, o aproximadamente 45,0 mg/ml hasta aproximadamente 50,0 mg/ml. En otras formas de realización, la composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno en una concentración de aproximadamente 15,0 mg/ml, aproximadamente 16,0 mg/ml, aproximadamente 17,0 mg/ml, aproximadamente 18,0 mg/ml, aproximadamente 19,0 mg/ml, aproximadamente 20,0 mg/ml, aproximadamente 21,0 mg/ml, aproximadamente 22,0 mg/ml, aproximadamente 23,0 mg/ml, aproximadamente 24,0 mg/ml, o aproximadamente 25,0 mg/ml. La composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, y un tampón que mantiene el pH de la formulación en el intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, incluyendo pH de aproximadamente 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, y otros valores semejantes dentro del intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0. En algunas formas de realización, el tampón mantiene el pH de la formulación en el intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 6,5, aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 6,0, aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 5,5, aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente 7,0, aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente pH 6,5, o aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente pH 6,0.

En la formulación puede usarse cualquier tampón adecuado que mantenga el pH de la formulación líquida del anticuerpo anti CD40 en el intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, siempre que la

estabilidad fisicoquímica y la actividad biológica deseada del anticuerpo se mantengan como se señaló anteriormente en el presente documento. Los tampones adecuados incluyen entre otros, ácidos convencionales y sus sales, en los que el contraión puede ser, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o magnesio. Ejemplos de ácidos convencionales y su sales que pueden usarse para tamponar la formulación farmacéutica líquida incluyen, entre otros, tampones de ácido succínico o succinato, ácido cítrico o citrato, ácido acético o acetato, ácido tartárico o tartrato, ácido fosfórico o fosfato, ácido glucónico o gluconato, ácido glutámico o glutamato, ácido aspártico o aspartato, ácido maleico o maleato y ácido málico o malato. La concentración del tampón en la formulación puede ser desde aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 50 mM, incluyendo aproximadamente 1 mM, 2 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, u otros valores semejantes dentro del intervalo de aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 50 mM. En algunas formas de realización, la concentración del tampón en la formulación es desde aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 15 mM, incluyendo aproximadamente 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, u otros valores semejantes dentro del intervalo de aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 15 mM.

En algunas formas de realización de la invención, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR 12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno y tampón succinato o tampón citrato a una concentración que mantiene el pH de la formulación en el intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, de preferencia aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 6,5. Por “tampón succinato” o “tampón citrato” se entiende un tampón que comprende una sal de ácido succínico o una sal de ácido cítrico, respectivamente. En una forma de realización de preferencia, el contraión de succinato o de citrato es el catión sodio y, por consiguiente, el tampón es succinato de sodio o citrato de sodio, respectivamente. Sin embargo, se espera que sea eficaz cualquier catión. Otros posibles cationes de succinato o de citrato incluyen, entre otros, potasio, amonio, calcio y magnesio. Como se señaló anteriormente, la concentración del tampón succinato o citrato en la formulación puede ser desde aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 50 mM, incluyendo aproximadamente 1 mM, 2 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, u otros valores semejantes dentro del intervalo desde aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 50 mM. En algunas formas de realización, la concentración de tampón en la formulación va desde aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 15 mM, incluyendo aproximadamente 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, o aproximadamente 15 mM. En otras formas de realización, la formulación farmacéutica líquida comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 50,0 mg/ml, o aproximadamente 5,0 mg/ml hasta aproximadamente 25,0 mg/ml, y tampón succinato o citrato, por ejemplo, tampón succinato de sodio o citrato de sodio, a una concentración de aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 20 mM, aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 15 mM, de preferencia aproximadamente 10 mM.

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

Los expertos en la técnica están familiarizados con una diversidad de solutos farmacéuticamente aceptables útiles para proporcionar isotonicidad en las composiciones farmacéuticas. El agente de isotonicidad puede ser cualquier reactivo capaz de ajustar la presión osmótica de la formulación farmacéutica líquida de la presente invención hasta un valor prácticamente igual al de un líquido corporal. Es deseable utilizar un agente de isotonicidad fisiológicamente aceptable. Por consiguiente, la formulación farmacéutica líquida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, y un tampón para mantener el pH de la formulación dentro del intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, puede comprender además componentes que pueden usarse para proporcionar isotonicidad, por ejemplo, cloruro de sodio; aminoácidos tales como alanina, valina y glicina; azúcares y alcoholes de azúcares (polioles), incluidos, entre otros, glucosa, dextrosa, fructosa, sacarosa, maltosa, manitol, trehalosa, glicerol, sorbitol, y xilitol; ácido acético, otros ácidos orgánicos y sus sales, y cantidades relativamente menores de citratos o fosfatos. El experto en la técnica conocerá agentes adicionales que son adecuados para proporcionar la tonicidad óptima de la formulación líquida.

En algunas formas de realización de preferencia, la formulación farmacéutica líquida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, y un tampón para mantener el pH de la formulación dentro del intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0 comprende además cloruro de sodio como el agente de isotonicidad. La concentración de cloruro de sodio en la formulación dependerá de la contribución de otros

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

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

Los tensioactivos típicos utilizados son tensioactivos no iónicos, incluidos los ésteres de polioxietilensorbitol tales como polisorbato 80 (Tween 80) y polisorbato 20 (Tween 20); ésteres de polioxipropileno-polioxietileno tales como Pluronic F68; alcoholes de polioxietileno tales como Brij 35; simeticona; polietilenglicol tal como PEG400; lisofosfatidilcolina; y polioxietilen-p-t-octilfenol tal como Triton X-100. La estabilización clásica de compuestos farmacéuticos por medio de tensioactivos o emulsionantes se describe, por ejemplo, en Levine y col. (1991) J. Parenteral Sci. Technol. 45(3): 160-165. Un tensioactivo de preferencia utilizado en la práctica de la presente invención es polisorbato 80. Cuando se incluye un tensioactivo, éste se añade típicamente en una cantidad desde aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 1,0% (p/v), de aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 0,5%, de aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 0,4%, de aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 0,3%, e aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 0,2%, de aproximadamente 0,005% hasta aproximadamente 0,5%, de aproximadamente 0,005% hasta aproximadamente 0,2%, de aproximadamente 0,01% hasta aproximadamente 0,5%, de aproximadamente 0,01% hasta aproximadamente 0,2%, de aproximadamente 0,03% hasta aproximadamente 0,5%, de aproximadamente 0,03% hasta aproximadamente 0,3%, de aproximadamente 0,05% hasta aproximadamente 0,5%, o de aproximadamente 0,05% hasta aproximadamente 0,2%.

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

hasta aproximadamente 20 mM; incluyendo succinato de sodio o citrato de sodio de aproximadamente 10 mM; cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 200 mM, incluyendo aproximadamente 150 mM; y opcionalmente un tensioactivo, por ejemplo, polisorbato 80, en una cantidad de aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 1,0%, incluyendo aproximadamente de 0,001% hasta aproximadamente 0,5%; en la que la formulación farmacéutica líquida tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 6,0, de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 5,5, de aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente pH 6,5, o de aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente pH 6,0.

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

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

Uso de anticuerpos anti CD40 antagonistas en la fabricación de medicamentos

La presente invención también proporciona el uso de un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno en la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer que expresa CD40 en un sujeto, en el que el medicamento está coordinado con el tratamiento con IL-2 o una variante biológicamente activa de la misma. Por "cáncer que expresa CD40" se entiende cualquier cáncer que comprende células neoplásicas que expresan el antígeno de superficie celular CD40. Como se ha indicado en el presente documento en lo que antecede, dichos cánceres incluyen, entre otros, cánceres relacionados con las células B, por ejemplo, linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, linfoma de células B, linfoma de células B de grado alto, linfoma de células B de grado intermedio, linfoma de células B de grado bajo, leucemia linfoblástica aguda de células B, leucemia mieloblástica, enfermedad de Hodgkin, plasmacitoma, linfoma folicular, linfoma folicular de células pequeñas hendidas, linfoma folicular de células grandes, linfoma folicular mixto de células pequeñas hendidas, linfoma difuso de células pequeñas hendidas, linfoma linfocítico difuso de células pequeñas, leucemia prolinfocítica, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de zona marginal, linfoma tisular linfoide asociado a mucosas, linfoma monocitoide de células B, linfoma esplénico, leucemia de células vellosas, linfoma difuso de células grandes, linfoma mediastínico de células B grandes, granulomatosis linfomatoide, linfomatosis intravascular, linfoma difuso de células mixtas, linfoma difuso de células grandes, linfoma inmunoblástico, linfoma de Burkitt, linfoma relacionado con el SIDA y linfoma de células del manto; y tumores sólidos que expresan el antígeno CD40, incluidos, entre otros, cánceres de ovarios, de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas), de mama, de colon, de riñón (incluidos, por ejemplo, carcinomas de células renales), de vejiga urinaria, de hígado (incluidos, por ejemplo, los carcinomas hepatocelulares), gástrico, cervical, próstata, nasofaríngeo, tiroideo (por ejemplo, carcinoma papilar tiroideo) y de piel, tal como melanoma, y sarcomas (incluidos, por ejemplo, osteosarcomas y sarcomas de Ewing).

Por "coordinado" se entiende que el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno se usará antes, durante, o después del tratamiento del sujeto con IL-2 o una variante biológicamente activa de la misma. En una forma de realización tal, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 en la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer que expresa CD40 en un sujeto, en el que el medicamento está coordinado con el tratamiento con IL-2 o una variante biológicamente activa de la misma, por ejemplo IL-2 humana o la muteína IL-2 humana des-alanil-1, serina 125, en el que el medicamento debe usarse antes, durante o después del tratamiento del sujeto con IL-2 o con una variante biológicamente activa de la misma.

En algunas formas de realización, el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 descrito en la memoria descriptiva, o su fragmento de unión a antígeno, está coordinado con el tratamiento con IL-2 o una variante biológicamente activa de la misma y al menos otro tipo de terapia contra el cáncer. Ejemplos de otras terapias contra el cáncer incluyen, entre otras, las descritas en lo que antecede en el presente documento, es decir cirugía o procedimientos quirúrgicos (por ejemplo, esplenectomía, hepatectomía, linfadenectomía, leucoforesis, trasplante de médula ósea, y similares); radioterapia; quimioterapia, opcionalmente en combinación con trasplante autólogo de médula ósea, en las que los agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, entre otros, fludarabina o fosfato de fludarabina, clorambucilo, vincristina, pentostatina, 2-cloro-

desoxiadenosina (cladribina), ciclofosfamida, doxorubicina, prednisona, y sus combinaciones, por ejemplo, regímenes que contienen antraciclina tales como CAP (ciclofosfamida, doxorubicina más prednisona), CHOP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona más doxorubicina), VAD (vincristina, doxorubicina, más dexametasona), MP (melfalán más prednisona), y otros agentes citotóxicos y/o terapéuticos usados en quimioterapia tales como mitoxantrona, daunorubicina, idarubicina, asparaginasa, y antimetabolitos, incluidos, entre otros, citarabina, metotrexato, 5-fluorouracilo decarbazina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina y nelarabina; otra terapia anticancerosa con anticuerpos monoclonales (por ejemplo, alemtuzumab (Campath®) u otro anticuerpo anti CD52 dirigido a la glicoproteína de superficie celular CD52 en células B malignas; rituximab (Rituxan®), el anticuerpo HuMax-CD20 totalmente humano, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar®), ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), o cualquier otro anticuerpo anti CD20 terapéutico dirigido al antígeno CD20 en células B malignas; anticuerpo anti CD19 (por ejemplo, MT103, un anticuerpo biespecífico); anticuerpo anti CD22 (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal humanizado epratuzumab); bevacizumab (Avastin®) u otro anticuerpo anticanceroso dirigido al factor de crecimiento vascular endotelial humano; anticuerpo anti CD22 dirigido al antígeno CD22 en células B malignas (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal BL-22, una toxina alfaCD22); anticuerpo α -M-CSF dirigido al factor estimulante de colonias de macrófagos; anticuerpos dirigidos al activador del receptor del factor kappaB nuclear (RANK) y su ligando (RANKL), que se sobreexpresan en el mieloma múltiple; anticuerpo anti CD23 dirigido al antígeno CD23 en células B malignas (por ejemplo, IDEC-152); anticuerpo anti CD80 dirigido al antígeno CD80 (por ejemplo, IDEC-114); anticuerpo anti CD38 dirigido al antígeno CD38 en células B malignas; anticuerpos dirigidos a los receptores del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (anticuerpos anti MHC) expresados en células B malignas; otros anticuerpos anti CD40 (por ejemplo, SGN-40) dirigidos al antígeno CD40 en células B malignas; y anticuerpos dirigidos al receptor 1 del ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL-R1) (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal agonista humano HGS-ETR1) y TRAIL-R2 expresado en una serie de tumores sólidos y tumores de origen hematopoyético; terapia del cáncer basada en moléculas pequeñas, incluidos, entre otros, inhibidores de los microtúbulos y/o de la topoisomerasa (por ejemplo, el inhibidor mitótico dolastatina y análogos de dolastatina; el agente de unión a tubulina T900607; XL119; y el inhibidor de la topoisomerasa aminocamptotecina), SDX-105 (clorhidrato de bendamustina), ixabepilona (un análogo de epotilona, también llamado BMS-247550), inhibidores de la proteínasa C, por ejemplo, midostaurina ((PKC-412, CGP 41251, N-benzilstaurosporina), pixantrona, eloxatina (un agente antineoplásico), ganite (nitrato de galio), Thalomid® (talidomida), derivados inmunomoduladores de la talidomida (por ejemplo, revlimid (anteriormente revimid)), Affinitak™ (inhibidor antisentido de la proteínasa C-alfa), SDX-101 (R-etodolac, que induce la apoptosis de linfocitos malignos), análogos de nucleósidos de purina de segunda generación tales como clofarabina, inhibidores de la producción de la proteína Bcl-2 por células cancerosas (por ejemplo, los agentes antisentido oblimersen y Genasense®), inhibidores de proteasoma (por ejemplo, Velcade™ (bortezomib)), inhibidores de cinasas de molécula pequeña (por ejemplo, CHIR-258), inhibidores de VEGF de molécula pequeña (por ejemplo, ZD-6474), inhibidores de la proteína del choque térmico (HSP) 90 de molécula pequeña (por ejemplo, 17-AAG), agentes inhibidores de desacetilasas de histonas de molécula pequeña (por ejemplo, HPC híbrido/polar de citodiferenciación) tales como ácido suberanolhidroxámico (SAHA), y FR-901228 y agentes apoptóticos tales como Trisenox® (tríóxido de arsénico) y Xcytrin® (motexafina gadolinio); terapias contra el cáncer basadas en vacunas/inmunoterapia, incluidos, entre otros, enfoques de vacunas (por ejemplo, Id-KLH, oncofago, viraletina), inmunoterapia personalizada o inmunoterapia activa de idiopio (por ejemplo, MyVax® Personalized Immunotherapy, denominada formalmente GTOP-99), Promune® (CpG 7909, un agonista sintético para el receptor de tipo toll 9 (TLR9)), terapia con interferón alfa, terapia con IL-12, terapia con IL-15 y terapia con IL-21; terapia con esteroides; u otra terapia contra el cáncer; en las que el tratamiento con la IL-2 o una variante de la misma biológicamente activa y la terapia anticancerosa adicional, o terapias anticancerosas adicionales, se administra antes de, durante, o posteriormente al tratamiento del sujeto con el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno, como se ha indicado en lo que antecede en el presente documento. Cuando el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno está coordinado con la IL-2 o la variante biológicamente activa de la misma y al menos otra terapia anticancerosa, el uso del medicamento puede ser antes, durante o después del tratamiento del sujeto con cualquiera o todas las demás terapias anticancerosas.

La presente invención también proporciona el uso de una combinación sinérgica de un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno en la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer que expresa CD 40 en un sujeto, como se ha definido en lo que antecede en el presente documento, en el que el medicamento está coordinado con tratamiento con IL-2 o su variante biológicamente activa. Por “combinación sinérgica” se entiende que el medicamento comprende una cantidad del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno que proporciona un efecto terapéutico sinérgico cuando el medicamento está coordinado con tratamiento con IL-2 o su variante biológicamente activa del modo indicado en lo que antecede en el presente documento. “Efecto terapéutico sinérgico” se refiere a un efecto terapéutico observado con una combinación de dos o más terapias (en este caso, la terapia con el anticuerpo anti CD40 antagonista y la terapia con IL-2) en el que el efecto terapéutico (medido por cualquiera de una serie de parámetros, incluidas las medidas de eficacia descritas en lo que antecede en el presente documento) es superior a la suma de los efectos terapéuticos individuales respectivos observados con las respectivas terapias individuales.

En una forma de realización tal, la presente invención proporciona el uso de una combinación sinérgica del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 en la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer que expresa CD40 en un sujeto, en el que el medicamento está coordinado con tratamiento con IL-2 o su variante biológicamente activa, por ejemplo la IL-2 humana o la muteína de IL-2 humana des-alanil-1 serina 125, en el que el medicamento se debe usar antes, durante o después del tratamiento del sujeto con IL-2 o su variante biológicamente activa. En algunas formas de realización, el medicamento que comprende la combinación sinérgica del anticuerpo anti CD40 antagonista,

por ejemplo el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 descrito en el presente documento, o su fragmento de unión al antígeno, está coordinado con el tratamiento IL-2 o su variante biológicamente activa y con al menos otro tipo de terapia contra el cáncer como se ha indicado en lo que antecede en el presente documento,

5 La invención también proporciona el uso de un anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 que se da a conocer en el presente documento, o su fragmento de unión al antígeno en la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer que expresa CD40 en un sujeto, como se ha definido en lo que antecede en el presente documento, en el que el medicamento se usa en un sujeto que ha recibido tratamiento previo con IL-2 o una variante biológicamente activa de la misma. Por “pretratado” o “tratamiento previo” se entiende
10 que el sujeto ha recibido terapia con IL-2 (es decir, ha sido tratado con IL-2 o una variante biológicamente activa de la misma.) antes de recibir el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno. “Pretratado” o “tratamiento previo” incluye sujetos que han sido tratados con IL-2 o una variante biológicamente activa de la misma, sola o en combinación con otras terapias contra el cáncer, en el plazo de 2 años, en el plazo de 18 meses, en el plazo de 1 año, en el plazo de 6 meses, en el plazo de 2 meses, en el plazo de 6 semanas,
15 en el plazo de 1 mes, en el plazo de 4 semanas, en el plazo de 3 semanas, en el plazo de 2 semanas, en el plazo de 1 semana, en el plazo de 6 días, en el plazo de 5 días, en el plazo de 4 días, en el plazo de 3 días, en el plazo de 2 días, o incluso en el plazo de 1 día antes del inicio del tratamiento con el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 que se dan a conocer en el presente documento, o su fragmento de unión al antígeno. No es necesario que el sujeto haya respondido al tratamiento previo con la anterior terapia con IL-2 o las anteriores terapias con IL-2 y terapias contra el cáncer. Por consiguiente,
20 el sujeto que recibe el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno podría haber respondido, o podría no haber respondido, al tratamiento previo con la anterior terapia con IL-2 o a una o más terapias anteriores contra el cáncer donde el tratamiento previo comprendía múltiples terapias contra el cáncer, una de las cuales era terapia con IL-2, por ejemplo terapia con IL-2 y otra terapia anticancerosa con anticuerpos, por ejemplo rituximab u otra terapia con anticuerpos anti CD20; terapia con IL-2 y cirugía; terapia con IL-2 y quimioterapia; o terapia con IL-2, quimioterapia y otra terapia anticancerosa con anticuerpos.

Por tanto, en algunas formas de realización, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 descrito en el presente documento, o su
30 fragmento de unión a antígeno, en la fabricación de un medicamento que se usa en un sujeto que necesite tratamiento para un cáncer que expresa CD40 definido en lo que antecede en el presente documento, en el que el sujeto ha sido pretratado con terapia con IL-2 o ha sido pretratado con terapia con IL-2 y una o más de las otras siguientes terapias contra el cáncer: cirugía o procedimientos quirúrgicos (por ejemplo, esplenectomía, hepatectomía, linfadenectomía, leucoforesis, transplante de médula ósea, y similares); radioterapia; quimioterapia, opcionalmente en combinación
35 con trasplante autólogo de médula ósea, en las que los agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, entre otros, fludarabina o fosfato de fludarabina, clorambucilo, vincristina, pentostatina, 2-clorodesoxiadenosina (cladribina), ciclofosfamida, doxorubicina, prednisona, y sus combinaciones, por ejemplo, regímenes que contienen antraciclina tales como CAP (ciclofosfamida, doxorubicina más prednisona), CHOP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona más doxorubicina), VAD (vincristina, doxorubicina, más dexametasona), MP (melfalán más prednisona), y otros agentes citotóxicos y/o terapéuticos usados en quimioterapia tales como mitoxantrona, daunorubicina, idarubicina, asparaginasa, y antimetabolitos, incluidos, entre otros, citarabina, metotrexato, 5-fluorouracilo decarbazina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina y nelarabina; otra terapia anticancerosa con anticuerpos monoclonales (por ejemplo, alemtuzumab (Campath®) u otro anticuerpo anti CD52 dirigido a la glicoproteína de superficie celular CD52 en células B malignas; rituximab (Rituxan®), el anticuerpo HuMax-CD20 totalmente humano, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-
45 133, tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar®), ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), o cualquier otro anticuerpo anti CD20 terapéutico dirigido al antígeno CD20 en células B malignas; anticuerpo anti CD19 (por ejemplo, MT103, un anticuerpo bispecífico); anticuerpo anti CD22 (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal humanizado epratuzumab); bevacizumab (Avastin®) u otro anticuerpo anticanceroso dirigido al factor de crecimiento vascular endotelial humano; anticuerpo anti CD22 dirigido al antígeno CD22 en células B malignas (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal BL-22, una toxina alfaCD22); anticuerpo α -M-CSF dirigido al factor estimulante de colonias de macrófagos; anticuerpos dirigidos al activador del receptor del factor kappaB nuclear (RANK) y su ligando (RANKL), que se sobreexpresan en el mieloma múltiple; anticuerpo anti CD23 dirigido al antígeno CD23 en células B malignas (por ejemplo, IDEC-152); anticuerpo anti CD80 dirigido al antígeno CD80 (por ejemplo, IDEC-114); anticuerpo anti CD38 dirigido al antígeno CD38 en células B malignas; anticuerpos dirigidos a los receptores del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (anticuerpos anti MHC) expresados en células B malignas; otros anticuerpos anti CD40 (por ejemplo, SGN-40) dirigidos al antígeno CD40 en células B malignas; y anticuerpos dirigidos al receptor 1 del ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL-R1) (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal agonista humano HGS-ETR1) y TRAIL-R2 expresado en una serie de tumores sólidos y tumores de origen hematopoyético);
50 terapia del cáncer basada en moléculas pequeñas, incluidos, entre otros, inhibidores de los microtúbulos y/o de la topoisomerasa (por ejemplo, el inhibidor mitótico dolastatina y análogos de dolastatina; el agente de unión a tubulina T900607; XL119; y el inhibidor de la topoisomerasa aminocamptotecina), SDX-105 (clorhidrato de bendamustina), ixabepilona (un análogo de epotilona, también llamado BMS-247550), inhibidores de la proteínasa C, por ejemplo, midostaurina ((PKC-412, CGP 41251, N-benzoilstaurosporina), pixantrona, eloxatina (un agente antineoplásico), ganite (nitrato de galio), Thalomid® (talidomida), derivados inmunomoduladores de la talidomida (por ejemplo, revlimid (anteriormente revimid)), Affinitak™ (inhibidor antisentido de la proteínasa C-alfa), SDX-101 (R-etodolac, que induce la apoptosis de linfocitos malignos), análogos de nucleósidos de purina de segunda generación tales como clofarabina, inhibidores de la producción de la proteína Bcl-2 por células cancerosas (por ejemplo, los agentes antisentido oblimersen y Genasense®), inhibidores de proteasoma (por ejemplo, Velcade™ (bortezomib)), inhibidores de

cinasas de molécula pequeña (por ejemplo, CHIR-258), inhibidores de VEGF de molécula pequeña (por ejemplo, ZD-6474), inhibidores de la proteína del choque térmico (HSP) 90 de molécula pequeña (por ejemplo, 17-AAG), agentes inhibidores de desacetilasas de histonas de molécula pequeña (por ejemplo, HPC híbrido/polar de citodiferenciación) tales como ácido suberanilohidroxámico (SAHA), y FR-901228 y agentes apoptóticos tales como Trisenox® (tríóxido de arsénico) y Xcytrin® (motexafina gadolinio); terapias contra el cáncer basadas en vacunas/inmunoterapia, incluidos, entre otros, enfoques de vacunas (por ejemplo, Id-KLH, oncofago, vtaletina), inmunoterapia personalizada o inmunoterapia activa de idiotipo (por ejemplo, MyVax® Personalized Immunotherapy, denominada formalmente GTOP-99), Promune® (CpG 7909, un agonista sintético para el receptor de tipo toll 9 (TLR9)), terapia con interferón alfa, terapia con IL-12, terapia con IL-15 y terapia con IL-21; terapia con esteroides; u otra terapia contra el cáncer.

La presente invención también proporciona el uso de IL-2 o una variante de la misma biológicamente activa en la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer que expresa CD40 en un sujeto, como se ha definido en lo que antecede en el presente documento, en el que el medicamento está coordinado con tratamiento con un anticuerpo anti CD40 antagonista o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En estas formas de realización, por "coordinado" se entiende que el medicamento que comprende la IL-2 o su variante biológicamente activa se debe usar antes, durante o del tratamiento del sujeto con anticuerpo anti CD40 antagonista o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En una forma de realización tal, la presente invención proporciona el uso de IL-2 o una variante biológicamente activa de la misma, por ejemplo, IL-2 humana o la muteína IL-2 humana des-alanil-1, serina 125, en la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer que expresa CD40 en un sujeto, en el que el medicamento está coordinado con tratamiento con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, en el que el medicamento debe usarse antes, durante o después del tratamiento del sujeto con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9.

En algunas formas de realización, el medicamento que comprende la IL-2 o su variante biológicamente activa está coordinado con tratamiento con el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión a antígeno, y con al menos otro tipo de terapia anticancerosa. Ejemplos de otras terapias contra el cáncer incluyen, entre otras, las descritas en lo que antecede en el presente documento, es decir cirugía o procedimientos quirúrgicos (por ejemplo, esplenectomía, hepatectomía, linfadenectomía, leucoforesis, trasplante de médula ósea, y similares); radioterapia; quimioterapia, opcionalmente en combinación con trasplante autólogo de médula ósea, en las que los agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, entre otros, fludarabina o fosfato de fludarabina, clorambucilo, vincristina, pentostatina, 2-clorodesoxiadenosina (cladribina), ciclofosfamida, doxorubicina, prednisona, y sus combinaciones, por ejemplo, regímenes que contienen antraciclina tales como CAP (ciclofosfamida, doxorubicina más prednisona), CHOP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona más doxorubicina), VAD (vincristina, doxorubicina, más dexametasona), MP (melfalán más prednisona), y otros agentes citotóxicos y/o terapéuticos usados en quimioterapia tales como mitoxantrona, daunorubicina, idarubicina, asparaginasa, y antimetabolitos, incluidos, entre otros, citarabina, metotrexato, 5-fluorouracilo decarbazina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina y nelarabina; otra terapia anticancerosa con anticuerpos monoclonales (por ejemplo, alemtuzumab (Campath®) u otro anticuerpo anti CD52 dirigido a la glicoproteína de superficie celular CD52 en células B malignas; rituximab (Rituxan®), el anticuerpo HuMax-CD20 totalmente humano, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar®), ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), o cualquier otro anticuerpo anti CD20 terapéutico dirigido al antígeno CD20 en células B malignas; anticuerpo anti CD19 (por ejemplo, MT103, un anticuerpo biespecífico); anticuerpo anti CD22 (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal humanizado epratuzumab); bevacizumab (Avastin®) u otro anticuerpo anticanceroso dirigido al factor de crecimiento vascular endotelial humano; anticuerpo anti CD22 dirigido al antígeno CD22 en células B malignas (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal BL-22, una toxina alfaCD22); anticuerpo α -M-CSF dirigido al factor estimulante de colonias de macrófagos; anticuerpos dirigidos al activador del receptor del factor kappaB nuclear (RANK) y su ligando (RANKL), que se sobreexpresan en el mieloma múltiple; anticuerpo anti CD23 dirigido al antígeno CD23 en células B malignas (por ejemplo, IDEC-152); anticuerpo anti CD80 dirigido al antígeno CD80 (por ejemplo, IDEC-114); anticuerpo anti CD38 dirigido al antígeno CD38 en células B malignas; anticuerpos dirigidos a los receptores del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (anticuerpos anti MHC) expresados en células B malignas; otros anticuerpos anti CD40 (por ejemplo, SGN-40) dirigidos al antígeno CD40 en células B malignas; y anticuerpos dirigidos al receptor 1 del ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL-R1) (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal agonista humano HGS-ETR1) y TRAIL-R2 expresado en una serie de tumores sólidos y tumores de origen hematopoyético); terapia del cáncer basada en moléculas pequeñas, incluidos, entre otros, inhibidores de los microtúbulos y/o de la topoisomerasa (por ejemplo, el inhibidor mitótico dolastatina y análogos de dolastatina; el agente de unión a tubulina T900607; XL119; y el inhibidor de la topoisomerasa aminocamptotecina, SDX-105 (clorhidrato de bendamustina), ixabepilona (un análogo de epotilona, también llamado BMS-247550), inhibidores de la proteína cinasa C, por ejemplo, midostaurina ((PKC-412, CGP 41251, N-benzilstaurosporina), pixantrona, eloxatina (un agente antineoplásico), ganite (nitrato de galio), Thalomid® (talidomida), derivados inmunomoduladores de la talidomida (por ejemplo, revlimid (anteriormente revimid)), Affinitak™ (inhibidor antisentido de la proteína cinasa C-alfa), SDX-101 (R-etodolac, que induce la apoptosis de linfocitos malignos), análogos de nucleósidos de purina de segunda generación tales como clofarabina, inhibidores de la producción de la proteína Bcl-2 por células cancerosas (por ejemplo, los agentes antisentido oblimersen y Genasense®), inhibidores de proteasoma (por ejemplo, Velcade™ (bortezomib)), inhibidores de cinasas de molécula pequeña (por ejemplo, CHIR-258), inhibidores de VEGF de molécula pequeña (por ejemplo, ZD-6474), inhibidores de la proteína del choque térmico (HSP) 90 de molécula pequeña (por ejemplo, 17-AAG), agentes inhibidores de desacetilasas de histonas de molécula pequeña (por ejemplo, HPC híbrido/polar de citodiferenciación) tales como ácido suberanilohidroxámico (SAHA), y FR-901228 y agentes apoptóticos tales como Trisenox® (tríóxido de arsénico) y Xcytrin® (motexafina gadolinio); terapias contra el cáncer basadas en vacunas/inmunoterapia, incluidos, entre otros, enfoques de vacunas (por ejemplo, Id-KLH, oncofago, vtaletina), inmunoterapia personalizada o inmunoterapia activa de idiotipo (por ejemplo, MyVax® Personalized Immunotherapy, denominada formalmente GTOP-99), Promune® (CpG 7909, un agonista sintético para el receptor de tipo toll 9 (TLR9)), terapia con interferón alfa, terapia con IL-12, terapia con IL-15 y terapia con IL-21; terapia con esteroides; u otra terapia contra el cáncer.

terapia activa de idiotipo (por ejemplo, MyVax® Personalized Immunotherapy, denominada formalmente GTOP-99), Promune® (CpG 7909, un agonista sintético para el receptor de tipo toll 9 (TLR9)), terapia con interferón alfa, terapia con IL-12, terapia con IL-15 y terapia con IL-21; terapia con esteroides; u otra terapia contra el cáncer; en las que el tratamiento con en anticuerpo anti CD40 antagonista o un fragmento de unión al antígeno del mismo y la terapia anticancerosa adicional o terapias anticancerosas adicionales, se producen antes, durante o después del tratamiento del sujeto con el medicamento que comprende la IL-2 o su variante, como se ha indicado en lo que antecede en el presente documento. Cuando el medicamento comprende IL-2 o su variante biológicamente activa está coordinado con tratamiento con el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión a antígeno y con al menos otra terapia anticancerosa, el uso del medicamento puede ser antes, durante o después del tratamiento del sujeto con cualquiera o con ambas terapias anticancerosas adicionales.

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

Parte experimental

Introducción

Los anticuerpos anti CD40 antagonistas usados en los ejemplos siguientes son CHIR-5.9 y CHIR-12.12. Los anticuerpos anti CD40 CHIR-5.9 y CHIR-12.12 son anticuerpos monoclonales (mAb) anti CD40 humanos del subtipo IgG1 humana generados por inmunización de ratones transgénicos que llevan el locus de la cadena pesada de la IgG1 humana y el locus de la cadena ligera κ humana (tecnología XenoMouse®; Abgenix; Fremont, California). Como inmunógeno se usaron células de insecto SF9 que expresan el dominio extracelular de CD40.

Brevemente, se fusionaron esplenocitos de ratones inmunizados con células de mieloma murino SP 2/0 o P 3 x 63Ag8.653 en una relación de 10:1 usando polietilenglicol al 50% como está descrito previamente por de Boer y col. (1988) J. Immunol. Meth. 113:143. Las células fusionadas se resuspendieron en medio IMDM completo suplementado con hipoxantina (0,1 mM), aminopterina (0,01 mM), timidina (0,016 mM), y 0,5 ng/ml de hIL-6 (Genzyme, Cambridge, Massachusetts). A continuación se distribuyeron las células fusionadas entre los pocillos de placas de cultivo tisular de 96 pocillos, de manera que cada una contenía 1 hibridoma en crecimiento de promedio.

Tras 10-14 días se analizaron los sobrenadantes de las poblaciones de hibridomas para detectar la producción de anticuerpos específicos. Para la detección de anticuerpos específicos por los clones de hibridoma, se combinaron los sobrenadantes de cada pocillo y se probaron para especificidad de actividad anti-CD 40 por ELISA en primer lugar. A continuación se usaron los positivos para tinción fluorescente de células de las células B transformadas con VEB usando un ensayo FACS. Las células de hibridomas positivos se clonaron dos veces por dilución límite en IMDM/FBS que contenía 0,5 ng/ml de hIL-6.

Se fusionó un total de 31 bazos de ratones con las células SP2/0 de mieloma de ratón para generar 895 anticuerpos que reconocen el CD40 recombinante en ELISA. De media, aproximadamente el 10% de los hibridomas producidos usando la tecnología Abgenix XenoMouse® (Abgenix; Fremont, California) pueden contener la cadena ligera lambda de ratón en lugar de la cadena kappa humana. Se seleccionaron los anticuerpos que contenían cadena ligera lambda de ratón y se descartaron. Se seleccionó una subpoblación de 260 anticuerpos que también mostraban unión al CD40 de superficie celular para su análisis posterior. Los hibridomas estables seleccionados durante una serie de procedimientos de subclonación se usaron para caracterización adicional en los ensayos de unión y funcionales.

Se identificaron clones de otros 7 hibridomas que tenían actividad antagonista. Según su potencia antagonista relativa y las actividades de ADCC, se seleccionaron dos clones de hibridoma para otra evaluación (Tabla 2 a continuación). Se denominan 131.2F8.5.9 (5.9) y 153.8E2.D10.D6.12.12 (12.12).

TABLA 2

Resumen del conjunto inicial de datos con anticuerpos IgG1 anti CD40 CHIR-5.9 y CHIR-12.12

Hibridoma madre	Clones de hibridoma	unión a la superficie celular	Antagonista	ADC C	CD C	CMCC #	Secuencia de ADN de la región V
131.2F5	131.2F5.8.5.9	+++	+++	++	-	12047	Sí
153.8E2	153.8E2D10D6.12.12	+++	+++	++++	-	12056	Si

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

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

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

Como se muestra por medio del análisis FACS, CHIR-5.9 y CHIR-12.12 se unen específicamente al CD40 humano y pueden prevenir la unión del ligando de CD40. Ambos mAb pueden competir con la unión previa del ligando de CD40 al CD40 de la superficie celular. La afinidad de unión de CHIR-5.9 al CD40 humano es $1,2 \times 10^{-8}$ M y la afinidad de unión de CHIR-12.12 al CD40 humano es 5×10^{-10} M.

Los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 son fuertes antagonistas e inhiben la proliferación *in vitro* de las células B normales mediada por el ligando de CD40, así como de las células cancerosas de pacientes con NHL y CLL. *In vitro*, ambos anticuerpos matan las células cancerosas primarias de pacientes con NHL por ADCC. Se observó actividad antitumoral dependiente de la dosis en un modelo de xenoinjerto de linfoma humano.

Ejemplo 1

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

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

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

Ejemplo 2

Propiedades de unión de los mAb CHIR-12.12 y CHIR-5.9

Se inmovilizó proteína A en chips biosensores CM5 a través de acoplamiento de aminas. Se capturaron anticuerpos monoclonales anti-CD40 humanos, a una concentración de 1,5 μ g/ml, sobre la superficie modificada del biosensor durante 1,5 minutos a 10 μ l/min. Se hizo fluir CD40-his recombinante soluble sobre la superficie del biosensor en concentraciones variables. El anticuerpo y el antígeno se diluyeron en HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005% (HBS-EP). Se determinaron las constantes cinéticas y de afinidad usando el programa informático Biaevaluation con un ajuste de interacción modelo/global de 1:1.

ES 2 346 977 T3

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

TABLA 3

Resumen de las propiedades de unión de los anticuerpos anti CD40 CHIR-5.9 y CHIR-12.12

Anticuerpo	Ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	KD (nM)
Anti-CD40,CHIR-5.9	(12,35 ± 0,64) × 10 ⁵	(15,0 ± 1,3) × 10 ⁻³	12,15 ± 0,35
Anti-CD40,CHIR-12.12	(2,41 ± 0,13) × 10 ⁵	(1,24 ± 0,06) × 10 ⁻⁴	0,51 ± 0,02

Ejemplo 3

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

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

Los resultados indican que el anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR12.12 reconoce epítopos tanto en la forma no reducida como en la forma reducida de CD40, en los que la forma no reducida de CD40 exhibe mayor intensidad que la forma reducida de CD40 (Tabla 4; transferencias no mostradas). El hecho de que el reconocimiento fuera positivo para ambas formas de CD40 indica que este anticuerpo interacciona con un epítipo conformacional, parte del cual es una secuencia lineal. El anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 reconoce principalmente la forma no reducida de CD40, lo que sugiere que este anticuerpo interacciona con un epítipo principalmente conformacional (Tabla 4; transferencias no mostradas).

TABLA 4

Identificación de dominios

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

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

El anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 reconoce un epítipo en el Dominio 2 tanto en condiciones reductoras como no reductoras (Tabla 5; transferencias no mostradas). Por el contrario, el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 exhibe un reconocimiento muy débil para el Dominio 2 (Tabla 5; transferencias no mostradas). Ninguno de estos anticuerpos reconoce los Dominios 1, 3 ó 4 en este análisis.

TABLA 5

Análisis del Dominio2

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

ES 2 346 977 T3

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

Los análisis SPOTs con el anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR-12.12 como sonda a una concentración de 10 µg/ml dieron reacciones positivas con las transferencias 18 a 22. La región de la secuencia cubierta por estos péptidos se muestra en la Tabla 6.

TABLA 6

Resultados del análisis SPOTs con anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR-12.12 como sonda

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

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

Los análisis SPOTs con mAb CHIR-5.9 mostraron un débil reconocimiento de los péptidos representados por las transferencias 20-22 mostradas en la Tabla 7, lo que sugiere implicación de la región YCDPNLGL (residuos 82-89 de la secuencia mostrada en SEC ID N° 10 o SEC ID N° 12) en su unión a CD40. Debe señalarse que los mAb CHIR-12.12 y CHR-5.9 compiten uno con el otro por la unión a CD40 en el análisis BIACORE.

TABLA 7

Resultados de análisis SPOTs con el anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR-5.9 como sonda

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

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

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

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

Ejemplo 4

El tratamiento de combinación con CHIR-12.12 e IL-2 muestra actividad antitumoral aditiva en modelos animales

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

El tratamiento de combinación con el mAb CHIR-12.12 e IL-2 se evaluó en un modelo de xenoinjerto NHL humano estadificado de Namalwa. Para asegurar el crecimiento constante del tumor, se irradió el cuerpo entero de ratones desnudos deficientes en células T con 3 Gy para suprimir adicionalmente el sistema inmune un día antes de la inoculación del tumor. Las células tumorales se inocularon por vía subcutánea en el costado derecho a 5×10^6 células por ratón. El tratamiento se inició cuando el volumen del tumor alcanzó aproximadamente 100-200 mm³ (aproximadamente 7 días después de la inoculación del tumor). Los ratones portadores del tumor se trataron del siguiente modo: (1) IgG1 a 10 mg/kg, por vía intraperitoneal, una vez a la semana durante 4 semanas; (2) mAb CHIR-12.12 a 1 mg/kg, por vía intraperitoneal, una vez a la semana durante 4 semanas; (3) IL-2 a 0,5 mg/kg, por vía subcutánea, diariamente durante 8 días; (4) IL-2 a 0,5 mg/kg, por vía subcutánea, diariamente durante 8 días + CHIR-12.12 a 1 mg/kg, por vía intraperitoneal, una vez a la semana durante 4 semanas; y (5) IL-2 a 0,5 mg/kg, por vía subcutánea, diariamente durante 8 días + CHIR-12.12 a 10 mg/kg, por vía intraperitoneal, una vez a la semana durante 4 semanas. Se registraron los volúmenes tumorales dos veces por semana. Los datos se analizaron usando ANOVA-CHIR-12.12 e IL-2 por separado inhibieron el crecimiento de los tumores de Namalwa (N= 10 ratones/grupo). La combinación de CHIR-12.12 e IL-2 dio como resultado una actividad antitumoral aditiva (Figura 5).

Ejemplo 5

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

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

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

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

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

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

CHIR-12.12 inhibió la expresión de proteínas antiapoptóticas de “supervivencia”

En estos experimentos, se estimularon $0,6 \times 10^6$ células B humanas normales de donadores sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95%) con sCD40L 1 μg/ml (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, RU). A continuación se añadió CHIR-12.12 (10 μg/ml) e IgG de control. Las células se recogieron a los 0 y 20 minutos, a las 2 horas, 6 horas,

18 horas y 26 horas. Se detectaron controles de Mcl-1, XIAP, CD40 y β actina en los lisados celulares por transferencia de tipo Western.

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

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

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

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

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

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

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

CHIR-12.12 inhibió la expresión de proteínas antiapoptóticas de “supervivencia” de una manera dependiente de la dosis

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

En estos experimentos, se privaron de suero durante cuatro horas en medio que contenía FBS al 1% $4,0 \times 10^6$ células B humanas normales de donadores sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95%) y se estimularon con sCD40L $1 \mu\text{g/ml}$ (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, RU) durante 20 minutos. Las células se recogieron a los 0 y 20 minutos. Se inmunoprecipitó CD40 usando anti CD40 policlonal (Santa Cruz Biotechnology, CA), y se sondeó en una transferencia Western con mAb anti TRAF2 (Santa Cruz Biotechnology, CA), mAb anti TRAF3 (Santa Cruz Biotechnology, CA), y mAb anti CD40 (Santa Cruz Biotechnology, CA).

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

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

Ejemplo 6

Formulación farmacéutica líquida para anticuerpos anti CD40 antagonistas

Se sabe que la estabilidad de las proteínas es sensible al pH de la solución porque la carga superficial de una proteína varía con el pH de la solución, lo que tiene como resultado estabilización o desestabilización. Por tanto, los pH no óptimos de las formulaciones pueden alterar la interacción electrostática, que conduce a la degradación física de un anticuerpo anti CD40 antagonista, tal como agregación, precipitación y similares. Los cambios en las condiciones de pH podrían también producir la rotura de los enlaces covalentes, lo que conduce a la degradación química, tal como fragmentación, desamidación y similares. Por tanto, este estudio se diseñó para identificar el pH óptimo de una solución para minimizar la degradación del anticuerpo anti CD40 antagonista debido a agregación, fragmentación y desamidación.

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

Materiales y procedimientos

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

La sustancia del fármaco anti CD40 utilizada para este estudio fue un lote a granel de anti CD40 (CHIR-12.12) purificado obtenido de células CHO. La composición de la sustancia del fármaco era de anticuerpo CHIR-12.12 9,7 mg/ml en citrato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, a pH 6,5. La muestra de control en el estudio era la sustancia del fármaco recibida, seguida por congelación a $\leq -60^{\circ}\text{C}$, descongelación a TA y probada junto con muestras de estabilidad en los puntos temporales predeterminados. Las muestras de estabilidad se prepararon por diálisis de la sustancia del fármaco contra disoluciones de diferentes pH y la concentración de CHIR-12.12 en cada una de las muestras se determinó por UV 280 tal como se presenta en la Tabla 8.

TABLA 8

Formulaciones de CHIR-12.12

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

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

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

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

SDS-PAGE

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

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC-HPLC)

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

Cromatografía de intercambio catiónico (CEX-HPLC)

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

*Resultados y discusión**Estudio de estabilidad conformacional*

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

Análisis SDS-PAGE

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

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

Análisis SEC-HPLC

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

TABLA 9

Resultados de SEC-HPLC de muestras de estabilidad de CHIR-12.12 en condiciones de tiempo real y de almacenamiento acelerado

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

Análisis CEX-FIPLC

El análisis CEX-HPLC detectó el CHIR-12.12 intacto como la especie del pico principal, las variantes ácidas eluyeron más temprano que las especies del pico principal y las variantes de adición de lisina en el extremo C terminal eluyeron después de las especies de pico principal. La Tabla 10 muestra la dependencia de los porcentajes de las especies restantes de CHIR-12.12 del pico principal y las variantes ácidas en el pH de la disolución. La muestra de control ya contenía un alto grado de especies ácidas (aproximadamente 33%), probablemente debido a los procesos de fermentación de etapa temprana y purificación. La susceptibilidad de CHIR-12.12 a las disoluciones de pH más alto se evidencia por dos hechos. Primero, la muestra de la formulación inicial a pH 9 ($t = 0$) ya generaba 12% más especies ácidas que el control. Segundo, el porcentaje de especies ácidas aumentó bruscamente con el aumento del pH. La degradación relacionada con el cambio de cargas se debe probablemente a la desamidación. Los datos anteriores indican que este tipo de degradación de CHIR-12.12 se redujo al mínimo a pH de aproximadamente 5,0-5,5.

TABLA 10

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

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

Conclusión

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

Ejemplo 7

Estudios clínicos con IL-2 y anticuerpos anti CD40 antagonistas

Objetivos clínicos

El objetivo general es proporcionar una terapia eficaz para tumores sólidos que expresan CD40 y cánceres relacionados con células B convirtiéndolos en dianas con una combinación de un anticuerpo anti CD40 antagonista e IL-2 o una variante biológicamente activa de la misma. Estos tumores incluyen tumores sólidos tales como carcinoma de vejiga urinaria, carcinoma de mama, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma de células escamosas, carcinoma papilar tiroideo, melanoma, carcinoma de ovarios, carcinoma de pulmón, carcinoma cervical, carcinoma gástrico, carcinoma hepático y sarcomas. Entre los cánceres relacionados con células B se incluyen linfoma de células B, linfoma linfocítico crónico (CLL), leucemia linfoblástica aguda (ALL), mieloma múltiple (MM), macroglobulinemia de Waldenstrom y enfermedad sistémica de Castleman. La señal para estas enfermedades se determina en fase II aunque puede obtenerse alguna medición de actividad en la fase I. El anticuerpo anti CD40 antagonista inicial es en CHIR-12.12 y el producto de IL-2 inicial Proleukin®, que contiene la muletina de IL-2 recombinante IL-2 des-alanil-1, serina 125 humana.

Fase I

- Evaluar la seguridad y la farmacocinética - aumento de estas dos oncoterapias en neoplasias malignas.
- Elegir la dosis de cada oncoterapia en base a la seguridad, tolerabilidad y cambio en los marcadores séricos de las dianas respectivas, es decir CD40. En general se busca una dosis máxima tolerable (DMT) para cada uno de estos anticuerpos cuando se usan en combinación, pero pueden resultar adecuadas otras indicaciones de eficacia (depleción células B CD40+, etc.) para buscar la dosis.
- Considerar más de una combinación de dosis especialmente para indicaciones diferentes, por ejemplo, la dosis para CLL puede ser diferente que la dosis para NHL. Por consiguiente, puede ser necesaria alguna búsqueda de dosis en fase II.
- A los pacientes se les administra la dosis semanalmente, con toma de muestras para farmacocinética (PK) en tiempo real. Inicialmente, la dosis máxima permitida es un ciclo de 4 semanas. La PK puede ser muy variable según la enfermedad estudiada, la densidad de CD40, etc.
- Este(os) ensayo(s) está(n) abierto(s) a sujetos con tumores sólidos CD40+ y linfoma de células B, CLL, y, potencialmente, otras neoplasias malignas.
- La decisión de interrumpir o continuar los estudios se basa en la seguridad, las dosis y las pruebas preliminares de actividad antitumoral, particularmente de naturaleza sinérgica.
- La actividad de la terapia de combinación determinada por la tasa de respuesta, se determina en la Fase II.
- Identificar dosis de combinación para la Fase II.

Fase II

Se iniciarán varios ensayos en los tipos de tumores mencionados anteriormente con concentración en tumores sólidos y en linfoma de células B, CLL y mieloma múltiple (MM). Pueden ser necesarios ensayos separados en NHL de grado bajo y de grado intermedio/alto ya que el CD40 puede tener una función diferente según el grado del linfoma. En el contexto de la fase II aleatorizada pueden analizarse más de una combinación de dosis y más de un régimen. II.

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

- CLL: pacientes que fueron resistentes a Campath® y quimioterapia.
- NHL de grado bajo: fracasos con Rituxan® o CHOP-R
- NHL intermedio: fracasos con CHOP-R
- Mieloma múltiple: fracasos con quimioterapia, fracasos con dexametasona más talidomida o fracasos con quimioterapia de dosis elevadas más trasplante de células madre
- ✓ La decisión de interrumpir o continuar con el estudio se basa en la prueba del concepto terapéutico en Fase II
- ✓ Determinar si puede usarse un marcador sustituto como indicación temprana de eficacia clínica
- ✓ Identificar las dosis para la Fase III.

Fase III

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

Ejemplo 8

Cálculo de las curvas de concentración sérica de IL-2-tiempo para las formulaciones farmacéuticas de IL-2

El área bajo la curva de concentración sérica-tiempo (AUC) de Proleukin® IL-2 administrada por vía subcutánea (SC) a 4,5 millones de unidades internacionales (MUI) (equivalente a aproximadamente 275 µg de proteína) se determinó usando datos de un estudio no publicado de VIH. Los perfiles de concentración sérica-tiempo se midieron en 8 pacientes de VIH no tratados previamente con IL-2 tras una exposición inicial a dosis de IL-2 en este estudio. Para cada paciente se calculó la AUC usando la norma trapezoidal lineal de hasta la última concentración medible y se extrapoló a 14 horas (software de Winnonlin, versión 3.1, Pharsight Corporation, California). La AUC₀₋₂₄ media, la SD y los límites de confianza del 95% superior e inferior a la dosis de 4,5 MUI se presentan en la Tabla 11.

El valor de AUC_{0-24} de Proleukin® IL-2 administrada SC a dosis equivalentes a 18 MUI (1100 μ g) se estimó usando datos de tres estudios diferentes en los que este producto de IL-2 se administró SC. Dos son estudios publicados, uno en pacientes con VIH (N= 3) (Piscitelli y col. (1996) *Pharmacotherapy* 16(5):754-759) y uno en pacientes de cáncer (N=7) (Kirchner y col. (1998) *Br. J. Clin. Pharmacol.* 46:5-10). El tercero es un estudio no publicado en el que se disponía de datos de concentración sérica-tiempo de 6 pacientes de cáncer tras dosis SC de IL-2. La similitud de la AUC en pacientes de cáncer y de VIH se estableció previamente (datos no publicados). Las dosis reales administradas en estos tres estudios variaron entre 18 y 34 MUI. Para los dos estudios publicados, los valores de la AUC hasta 24 horas (AUC_{0-24}) se normalizaron a la dosis de 18 MUI multiplicando la AUC por el cociente de 18 y la dosis real en UMI. Por ejemplo si se calculó una AUC_{0-24} para una dosis de 20 MUI de 400, la AUC_{0-24} normalizada sería $400 \cdot 18/20 = 360$. Para el estudio no publicado de pacientes de cáncer, los valores individuales de la AUC se calcularon a partir de los datos de concentración sérica-tiempo usando la norma trapezoidal lineal hasta las últimas concentraciones medibles y se extrapolaron hasta 24 horas (Software de Winnonlin, versión 3.1, Pharsight Corporation, California), después se normalizaron hasta la dosis de 18 MUI como se ha indicado en lo que antecede. La media global y la SD para los tres estudios se calcularon como la media ponderada de las medias y las varianzas, respectivamente, usando las ecuaciones 1 y 2.

$$1. \quad \bar{X}_p = \frac{(n_1 \bar{X}_1 + n_2 \bar{X}_2 + n_3 \bar{X}_3)}{(n_1 + n_2 + n_3)}$$

$$2. \quad SD_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2 + (n_3 - 1)s_3^2}{(n_1 + n_2 + n_3 - 3)}}$$

En las que $n_1, n_2, n_3, \bar{X}_1, \bar{X}_2, \bar{X}_3$ y s_1^2, s_2^2, s_3^2 , son el número de sujetos, las medias y las varianzas para cada uno de los tres estudios, respectivamente. $\bar{X}_p$ y SD_p son estimaciones de la media global y la desviación estándar. La AUC media global, la SD y los límites de confianza del 95% superior e inferior a la dosis de 18 MUI se presentan en la Tabla 11.

TABLA 11

AUC_{0-24} media ($\pm$ SD) obtenida tras la exposición inicial a una administración de una única dosis de Proleukin® IL-2 administrada por vía subcutánea

Dosis de Proleukin® IL-2 (MUI/ μ g)	AUC_{0-24} (UI*h/ml)	SD	LI del IC del 95% ¹	LS del IC del 95% ¹
4,5/275	51	14	23	78
6,0/367 ²	65		22	107
7,5/458	79	29	21	137
18/1100	344	127	90	598
¹ Límites superior (LS) e inferior (LI) de los intervalos de confianza del 95 % (IC) se calcularon como $ma \text{ media} \pm 2 \text{ SD}$. 2 SD.				
² Los valores para 6,0 MUI se estiman sobre la base de los valores reales para 4,5 MUI y 7,5 MUI.				

Similar a la Proleukin®IL-2, L2-7001, se administró una formulación líquida de IL-2 monomérica a pacientes de VIH a dosis que varían de 50 a 180 µg (datos no publicados. Las exposiciones obtenidas de este estudio medidas mediante la AUC se muestran en la tabla 12. Estos valores de exposición estaban dentro del intervalo de los valores de exposición generados usando Proleukin® IL-2 (Tabla 11).

TABLA 12

AUC₀₋₂₄ media (± SD) obtenida tras una exposición inicial a monomérica L2-7001

Dosis de L2-7001 (MUI/µg)	AUC ₀₋₂₄ (UI*h/ml)	SD
0,82/50	60	11
1,5/90	110	36
2,2/135	143	41
2,9/180	275	99

Los datos de exposición a IL-2 (AUC) se obtuvieron de la literatura publicada, en la que se administró SC IL-2 nativa humana recombinante a 8 pacientes de cáncer a dosis variables de 0,1 MU a 3,0 MU. Las AUC medias indicadas (% CV) para los niveles de dosis de 0,3, 1 y 3 MU fueron 120 (38), 177 (36) y 359 (46) U*h/ml (Gustavson (1998) J. Biol. Response Modifiers 1998:440-449). Como se indica en Thompson y col. 1987 Cancer Research 47:4202-4207, las unidades medidas en este estudio se normalizaron a unidades BRMP units (Rossio y col. (1986) Lymphokine Research 5 (suppl 1):S13S18), que se adoptaron más tarde como unidades internacionales (UI) por la OMS (Gearing y Thorpe (1988) J. Immunological Methods 114:3-9). Los valores de AUC generados en las condiciones del estudio también coinciden bien con la exposición establecida a Proleukin® IL-2.

Muchas modificaciones y otras formas de realización de las invenciones presentadas en el presente documento acudirán a la mente del experto en la técnica al que pertenecen estas invenciones que tienen el beneficio de las enseñanzas presentadas en las descripciones anteriores y las figuras asociadas. Por tanto, debe entenderse que las invenciones no se limitan a las formas de realización específicas descritas y que se pretende incluir dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y formas de realización descritas en el presente documento modificaciones y otras formas de realización. Aunque en el presente documento se emplean términos específicos, se usan en un sentido genérico y descriptivo únicamente y no con el propósito de limitación

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti CD40 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, para usar en un procedimiento de tratar a un sujeto humano de un cáncer que comprende células neoplásicas que expresan antígeno CD40, en el que dicho procedimiento comprende administrar a dicho sujeto una terapia de combinación, en el que dicha terapia comprende la administración de una cantidad eficaz del anticuerpo anti CD40 o un fragmento de unión a antígeno del mismo en combinación con una interleucina-2 (IL-2) o una variante biológicamente activa de la misma, en el que dicho anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo está exento de actividad agonista significativa cuando está unido al antígeno CD40 y se selecciona del grupo constituido por:

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

2. Uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti CD40 o un fragmento de unión a antígeno en combinación con interleucina-2 (IL-2) o una variante biológicamente activa de la misma, en la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto humano por un cáncer que comprende células neoplásicas que expresan antígeno CD40 mediante terapia de combinación, en el que dicho anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo está exento de actividad agonista significativa cuando está unido al antígeno CD40 y se selecciona del grupo constituido por:

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

3. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo anti CD40 es un anticuerpo humano.

4. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo anti CD40 se selecciona del grupo constituido por el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 y el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543.

5. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona del grupo constituido por:

- (i) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende un dominio variable de cadena ligera que contiene los residuos 44-54, 70-76 y 109-117 de la SEC ID N° 2 o la SEC ID N° 6;
- (ii) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene los residuos 50-54, 69-84 y 114-121 de SEC ID N° 4 o la SEC ID N° 7;

ES 2 346 977 T3

(iii) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio variable de cadena ligera que contiene los residuos 46-52, 70-72 y 111-116 de SEC ID N° 2 y SEC ID N° 6; y

5 (iv) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene los residuos 45-51, 72-74 y 115-120 de SEC ID N° 4; o SEC ID N° 7.

6. Un anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo o el uso de la reivindicación 5, en el que dicho anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por:

10

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

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

15

(iii) SEC ID N° 2;

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

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

20

(vi) SEC ID N° 4;

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

25

(viii) SEC ID N° 5;

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

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

30

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

(xii) SEC ID N° 2 y SEC ID N° 4; y

35

(xiii) SEC ID N° 2 y SEC ID N° 5.

7. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo o el uso de la reivindicación 5, en el que dicho anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por:

40

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

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

45

(iii) SEC ID N° 6;

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

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

50

(vi) SEC ID N° 7;

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

55

(viii) SEC ID N° 8;

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

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

60

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

(xii) SEC ID N° 6 y SEC ID N° 7; y

65

(xiii) SEC ID N° 6 y SEC ID N° 8.

8. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo o el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a dicho antígeno CD40 humano con una afinidad (K_D) de al menos 10^{-6} M.

5 9. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo o el uso de la reivindicación 8, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a dicho antígeno CD40 humano con una afinidad (K_D) de al menos 10^{-8} M.

10 10. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo o el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se produce en una línea celular CHO.

15 11. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en el que dicha terapia de combinación proporciona un efecto terapéutico sinérgico.

12. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en el que dicho fragmento de unión a antígeno de dicho anticuerpo anti CD40 se selecciona del grupo constituido por un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento Fv y un fragmento Fv de cadena sencilla.

20 13. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en el que dicha IL-2 es IL-2 humana o una variante biológicamente activa de la misma.

25 14. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o el uso de la reivindicación 13, en el que dicha variante de IL-2 humana es IL-2 desalanil-2, serina 125 humana.

15. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en el que el cáncer es un cáncer relacionado con células B o un tumor sólido.

30 16. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 15, en el que el cáncer relacionado con células B se selecciona del grupo constituido por linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, linfoma de células B, linfoma de células B de grado alto, linfoma de células B de grado intermedio, linfoma de células B de grado bajo, leucemia linfoblástica aguda de células B, leucemia mieloblástica, enfermedad de Hodgkin, plasmacitoma, linfoma folicular, linfoma folicular de células pequeñas hendidas, linfoma folicular de células grandes, linfoma folicular mixto de células pequeñas hendidas, linfoma difuso de células pequeñas hendidas, 35 linfoma linfocítico difuso de células pequeñas, leucemia prolinfocítica, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de zona marginal, linfoma tisular linfoide asociado a mucosas, linfoma monocitoide de células B, linfoma esplénico, leucemia de células vellosas, linfoma difuso de células grandes, linfoma mediastínico de células B grandes, granulomatosis linfomatoide, linfomatosis intravascular, linfoma difuso de células mixtas, linfoma difuso de células grandes, linfoma inmunoblástico, linfoma de Burkitt, linfoma relacionado con el SIDA y linfoma de células del manto.

40 17. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 15, en el que dicho tumor sólido se selecciona del grupo constituido por carcinoma de vejiga urinaria, carcinoma de mama, carcinoma hepático, carcinoma gástrico, carcinoma de colon, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma de células escamosas, carcinoma papilar tiroideo, melanoma, carcinoma de ovarios, carcinoma de pulmón, 45 carcinoma cervical, y sarcomas.

18. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en el que dicha IL-2 o variante de la misma y dicho anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo se administran de forma secuencial.

50 19. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en el que dicha IL-2 o variante de la misma y dicho anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo se administran de forma simultánea.

55 20. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo se administra de acuerdo con un régimen de dosificación seleccionado del grupo constituido por una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas y una vez cada cuatro semanas a lo largo de un periodo de tratamiento o para una duración fija de 4 semanas a 16 semanas dentro de dicho periodo de tratamiento en combinación con la administración de uno o más 60 ciclos de un régimen de dosificación de IL-2 constante durante dicho periodo de tratamiento, en el que dicho régimen de dosificación de IL-2 constante comprende un primer periodo de tiempo, en el que una dosis semanal total constante de IL-2, o de su variante biológicamente activa, se administra a dicho sujeto, y un segundo periodo de tiempo, en el que la administración de dicha IL-2 o de su variante biológicamente activa, se suspende en dicho sujeto.

65 21. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 20, en el que dicho primer periodo de tiempo tiene una duración de aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 12 semanas, y en el que dicho segundo periodo de tiempo tiene una duración de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 4 semanas.

22. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 21, en el que dicho primer periodo de tiempo tiene una duración de 4 semanas y en el que dicho segundo periodo de tiempo tiene una duración de 1 semana.

23. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 21, en el que una primera administración de dicho anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo comienza el día 1 de dicho periodo de tratamiento y en el que un primer ciclo de dicho régimen de dosificación constante de IL-2 se inicia en 10 días desde dicha primera administración de dicho anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo.

24. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 23, en el que dicho primer ciclo de dicho régimen de dosificación constante de IL-2 se inicia el día 8 de dicho periodo de tratamiento.

25. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 23, en el que dicho periodo de tratamiento comprende uno o más ciclos posteriores de dicho régimen de dosificación constante de IL-2 que se inicia en un plazo de 4 semanas tras la finalización de dicho primer ciclo de dicho régimen de dosificación constante de IL-2 o la finalización de cualquier ciclo posterior de dicho régimen de dosificación constante de IL-2, en el que dicha administración de dicho anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo continua a lo largo de dicho periodo de tratamiento.

26. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 20, en el que dicha dosis terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo está en el intervalo de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 30,0 mg/kg.

27. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 20, en el que dicha dosis semanal total constante de IL-2, o su variante biológicamente activa, se administra en forma de una dosis única o se reparte en una primera serie de dosis equivalentes que se administran de acuerdo con un régimen de dosificación de dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete veces a la semana.

28. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 27, en el que dicha IL-2 o su variante biológicamente activa se administra por una vía seleccionada del grupo constituido por intravenosa, intramuscular y subcutánea.

29. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 20, en el que dicha dosis semanal total constante de dicha IL-2, o su variante biológicamente activa, es una cantidad equivalente a una dosis semanal total de una IL-2 de referencia convencional administrada por la misma vía y con el mismo régimen de dosificación, en el que dicha dosis semanal total de la IL-2 de referencia convencional está en un intervalo de aproximadamente 1100 μ g (18,0 MUI) a aproximadamente 3300 μ g (54,0 MUI), en el que dicha dosis semanal total constante de dicha IL-2 o su variante biológicamente activa proporciona al menos 70% de la actividad celular de las asesinas naturales (NK) que es proporcionada por dicha dosis semanal total de la IL-2 de referencia convencional.

30. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 29, en el que dicha dosis semanal total de la IL-2 de referencia convencional es de aproximadamente 1100 μ g (18,0 MUI) a aproximadamente 2567 μ g (42,0 MUI), y en el que dicha dosis semanal total de la IL-2 de referencia convencional se reparte en tres dosis equivalentes que se administran de acuerdo con un régimen de dosificación de tres veces a la semana.

31. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo se administra de acuerdo con un régimen de dosificación seleccionado del grupo constituido por una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas y una vez cada cuatro semanas a lo largo de un periodo de tratamiento o para una duración fija de 4 semanas a 16 semanas dentro de dicho periodo de tratamiento en combinación con la administración de uno o más ciclos de un régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles durante dicho periodo de tratamiento, en el que dicho régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles comprende un primer periodo de tiempo, en el que se administra a dicho sujeto una dosis semanal total mayor de una IL-2, o su variante biológicamente activa, seguido por un segundo periodo de tiempo, en el que se administra a dicho sujeto una dosis semanal total menor de dicha IL-2, o su variante biológicamente activa.

32. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 31, en el que se administra a dicho sujeto una primera dosis de dicha IL-2, o su variante biológicamente activa antes de administrar una primera dosis de dicho anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo.

33. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 32, en el que dicha primera dosis de dicha IL-2, o su variante biológicamente activa se administra hasta un mes antes de dicha primera dosis de dicho anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno a dicho sujeto.

34. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 33, en el que dicha primera dosis de dicha IL-2, o su variante biológicamente activa se administra una semana antes de que se administre a dicho sujeto dicha primera dosis de dicho anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno.

35. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 31, en el que una primera dosis de dicha IL-2, o su variante biológicamente activa se administra a dicho sujeto de forma concurrente con una primera dosis de dicho anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo.

5 36. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 31, en el que una primera dosis de dicha IL-2, o su variante biológicamente activa se administra a dicho sujeto una semana después de que se administra a dicho sujeto una primera dosis de dicho anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno.

10 37. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 31, en el que dicha dosis terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo está en el intervalo de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 30,0 mg/kg.

15 38. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 31, en el que dicho régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles tiene una duración combinada de 4 semanas a 16 semanas.

39. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 38, en el que dicho primer periodo de dicho régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles tiene una duración de al menos 1 semana de dicha duración combinada de 4 semanas a 16 semanas.

20 40. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 38, en el que dicho primer periodo de tiempo de dicho régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles tiene una duración que es la mitad de dicha duración combinada de 4 semanas a 16 semanas.

25 41. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 31, en el que dicha dosis semanal total mayor de dicha IL-2 o su variante biológicamente activa se administra en forma de una dosis única o se reparte en una primera serie de dosis equivalentes que se se administran de acuerdo con un régimen de dosificación de dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete veces a la semana, y en el que dicha dosis semanal total menor de dicha IL-2 o su variante biológicamente activa se administra en forma de una dosis única o se reparte en una segunda serie de dosis equivalentes que se se administran de acuerdo con un régimen de dosificación de dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete veces a la semana.

35 42. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 41, en el que dicha IL-2 o su variante biológicamente activa se administra por una vía seleccionada del grupo constituido por intravenosa, intramuscular y subcutánea.

40 43. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 42, en el que dicha primera serie de dosis equivalentes se administra de acuerdo con un régimen de dosificación de tres veces a la semana, y en el que dicha segunda serie de dosis equivalentes se administra de acuerdo con un régimen de dosificación de tres veces a la semana.

44. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 31, en el que:

45 a) dicha dosis semanal total mayor de dicha IL-2 o su variante biológicamente activa es una cantidad equivalente a una dosis semanal total mayor de una IL-2 de referencia convencional administrada por la misma vía y con el mismo régimen de dosificación, en el que dicha dosis semanal total mayor de la IL-2 de referencia convencional está en un intervalo de aproximadamente 1834 μ g (30,0 MU) a aproximadamente 3300 μ g (54,0 MU), en el que dicha dosis semanal total mayor de dicha IL-2 o su variante terapéuticamente eficaz proporciona al menos 70% de la actividad de asesina natural (NK) que proporciona dicha dosis semanal total mayor de de la IL-2 de referencia convencional;

50 b) dicha dosis semanal total menor de dicha IL-2 o su variante biológicamente activa es una cantidad equivalente a una dosis semanal total menor de la IL-2 de referencia convencional administrada por la misma vía y con el mismo régimen de dosificación, en el que dicha dosis semanal total menor de la IL-2 de referencia convencional está en un intervalo de aproximadamente 1100 μ g (18,0 MU) a aproximadamente 2384 μ g (39,0 MU), en la que dicha dosis semanal total menor de IL-2 o su variante terapéuticamente eficaz proporciona al menos 70% de la actividad de asesina natural (NK) que proporciona dicha dosis semanal total menor de la IL-2 de referencia convencional; y

60 c) dicha dosis semanal total menor de dicha IL-2 o su variante biológicamente activa es menor que dicha dosis semanal total mayor de dicha IL-2 o su variante biológicamente activa.

45. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 44, en el que dicha dosis semanal total mayor de la IL-2 de referencia convencional es de aproximadamente 1834 μ g (30,0 MU) a aproximadamente 2567 μ g (42,0 MU), y dicha dosis semanal total menor de la IL-2 de referencia convencional es de aproximadamente 1100 μ g (18,0 MU) a aproximadamente 1834 μ g (30,0 MU).

46. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 45, en el que dicha dosis semanal total mayor de la IL-2 de referencia convencional es de aproximadamente 2567 μ g (42,0 MU), dicha dicha

dosis semanal total menor de la IL-2 de referencia convencional es de aproximadamente 1834 μg (30,0 MU) y en el que dicha dosis semanal total mayor de la IL-2 de referencia convencional y dicha dosis semanal total menor de la IL-2 de referencia convencional se reparten, cada una, en tres dosis equivalentes que se administran de acuerdo con un régimen de dosificación de tres veces a la semana.

47. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 31, que además comprende una interrupción en dicho régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles, en el que dicha interrupción comprende un periodo de tiempo sin administración de dicha IL-2 o su variante biológicamente activa entre dicho primer periodo de tiempo y dicho segundo periodo de tiempo de dicho régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles.

48. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 47, en el que dicha interrupción tiene una duración de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 4 semanas.

49. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 31, en el que dicho periodo de tratamiento comprende uno o más ciclos posteriores de dicho régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles que se inicia aproximadamente 1 semana a aproximadamente 4 semanas tras la finalización de un primer ciclo de dicho régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles o la finalización de cualquier ciclo posterior de dicho régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles, en el que dicha administración semanal de dicho anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo continúa a lo largo de dicho periodo de tratamiento.

50. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o uso de la reivindicación 49, en el que al menos un ciclo de dicho régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles comprende una interrupción en dicho régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles, en el que dicha interrupción comprende un periodo de tiempo sin administración de dicha IL-2 o su variante biológicamente activa entre dicho primer periodo de tiempo y dicho segundo periodo de tiempo de cualquier ciclo dado de dicho régimen de dosificación de IL-2 de dos niveles que comprende dicha interrupción.

51. El anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-50, en el que dicho anticuerpo anti CD40 o fragmento de unión a antígeno del mismo se administra por vía intravenosa o subcutánea.

FIGURA 1A

Cadena ligera de CHIR 12,12:

líder:

MALPAQLLGLLMLWVSGSSG

variable:

DIVMTQSPSLSTVTPGEPASISCRSSQSILLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQVLISLGSNRASG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQARQTPFTFGPGTKVDIR

constante:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIGURA 1B

Cadena pesada de CHIR 12,12:

líder:

MEFGLSWVFLVAILRGVQC

variable:

QVQLVESGEGGVVQGRSLRLSCAASGFTTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYEESNRYHAD
SVKGRFTISRDNKITLYLQMNSLRTEDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGTLVTVSS

constante:

ASTKGPSVFPLAPASKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

región constante alternativa:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURA 2A

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

5'atggcgctccctgctcagctcctggggctgctaagtctctgggtctctggatccagtggggatattgtgatgactcagctccactctc
cctgaccgtcacccctggagagccggcctccatctcctgcaggtccagtcagagcctcctgtatagtaatggatacaactatttgattg
gtacctgcagaagccagggcagctctccacaggtcctgatctcttgggttctaatacggcctccggggctccctgacaggttcagtgga
gtggatcaggcacagattttacactgaaaatcagcagagtgagggtgaggatgttgggggttattactgcatgcaagctcgacaaact
ccattcactttcggccctgggaccaaagtggatatcagacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagt
tgaaatctggaactgctctgttgtgtgcctgctgaataactctatcccagagagggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctcc
aatcgggtaactcccaggagagtgacacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaa
agcagactacgagaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcggcgtcacaaagagcttcaacaggg
gagagtgttag3'

FIGURA 2B

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

5'atggagtttgggctgagctgggtttccttgttgctattttaagaggtgtccagtgtcaggtgcagttgggtggagctcgggggagggcgt
ggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcctctggaftcaccttcagtagctatggcatgcactgggtccgccagggtc
caggcaaggggctggagtggtggcagttatatcatatgaggaaagtaatagataacatgcagactccgtgaaggggcggattacca
tctccagagacaattccaagatcacgctgtatctgcaaatgaacagcctcagaactgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagat
gggggtatagcagcacctgggcctgactactggggccagggaaccctgtgtaccgtctcctcagcaagtaccaaggggcccatccgt
cttccccctggcggcctagcaagagcacctctgggggcacagcggcctgggtgctgtcaaggactacttccccgaaccgg
tgacgggtgtcgtggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccgggtgtcctacagtcctcaggactctactccctcag
cagcgtgtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaaagcccagcaacaccaaggtgg
acaagagagttggtgagaggccagcacaggaggagggtgtgtctgtggaagccagggtcagcgtcctgctggacgcatccc
gctatgcagtcctcagtcagggcagcaaggcagggccctgtcctcttaccggaggcctctgcccggccactcatgctcagg
gagaggggtcttctggcttttccccaggctctgggcaggcacaggctaggtgtcccttaaccagggccttgcacacaaaggggcaggt
gtctgggtcagacctgccaagagccatatccgggaggacctgtccctgacctaaagccacccaaaggccaaactctccactccc
tcagctcggacaccttctctcctccagattccagtaactcccaatcttctctcagagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgc
ccaccgtgccaggtaagccagcccaggcctcggcctccagctcaaggcgggacaggtgccctagatgacctgcatccaggagac
aggccccagccgggtgtgacagctccactccatcttctcagcacctgaactcctggggggaccgtcagcttctcttcccccc
aaaacccaaggacacctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtgtgtgtggacgtgagccacgaagacctgaggtca
agttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgt
ggtcagcgtctcaccgtcctgcaccaggactgggtgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccagccc
ccatcgagaaaaccatctccaagccaaaggtgggacctgtgggtgtcaggggccacatggacagaggccggtcggcccaccc
tctgccctgagagtaccgtgtaccaacctctgtccctacaggggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatccggg
gaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtcaaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaa
tgggcagccggagaacaaactacaagaccacgcctccgtgtgactccgacggctccttctctctatagcaagctcaccgtggac
aagagcaggtggcagcagggaacgtcttctatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcc
ctgtctccgggtaaatga3'

FIGURA 3A

Cadena ligera de CHIR-5,9:

líder:

MALLAQLLGLLMLWVPGSSG

variable:

AIVMTQPPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWLQQRPGQPPRLLIYKFFRRLSG
VPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQVTQFPHTFGQGTRLEIK

constante:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIGURA 3B

Cadena pesada de CHIR-5,9:

líder:

MGSTAILALLLAVLQGVCA

variable:

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSP
SFQGGVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGTAAGR DYYYYYGM DVWGQGTTVTVS
S

constante:

ASTKGPSVFPLAPASKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

región constante alternativa:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURA 4A

Secuencia codificadora para la isoforma corta de CD40 humano:

```
1 atggttcgct tgcctctgca gtgcgtcctc tggggctgct tctgaccgc tgtccatcca
61 gaaccaccca ctgcatgcag agaaaaacag tacctaataa acagtcagtg ctgttctttg
121 tgccagccag gacagaaact ggtgagtgac tgcacagagt tcaactgaaac ggaatgcctt
181 ccttgcggtg aaagcgaatt cctagacacc tggaacagag agacacactg ccaccagcac
241 aaatactgcg accccaacct agggcttcgg gtccagcaga agggcacctc agaaacagac
301 accatctgca cctgtgaaga aggctggcac tgtacgagtg aggcctgtga gagctgtgtc
361 ctgcaccgct catgctcgcc cggctttggg gtcaagcaga ttgctacagg gggtttctgat
421 accatctgcg agccctgccc agtcggcttc ttctccaatg tgcacatctg ttctgaaaaa
481 tgcaccctt ggacaaggtc ccaggatcg gctgagagcc ctggtggtga tccccatcat
541 cttegggatc ctgttgcca tcctcttggg gctggtcttt atcaaaaagg tggccaagaa
601 gccaaccaat aa
```

FIGURA 4B

Isoforma corta codificada de CD40 humano:

```
1 mvrplqcvl wgclltavhp epptacrekq ylinsqccsl cpggqklvsd cteftetecf
61 pcgesefldt wnrethchqh kyedpnlglr vqqkgsetd tictceegwh ctseacescv
121 hrscspgfg vkqiatgvsd ticepcpvgf fsnvssafek chpwtrspgs aespqgdphh
181 lrdpvchplg aglyqkggqe anq
```

FIGURA 4C

Secuencia codificadora para la isoforma larga de CD40 humano:

```

1 atggttcgtc tgcctctgca gtgcgtcctc tggggctgct tgctgaccgc tgtccatcca
61 gaaccaccca ctgcatgcag agaaaaacag tacctaataa acagtcagtg ctgttctttg
121 tgccagccag gacagaaact ggtgagtgac tgcacagagt tcaactgaaac ggaatgcctt
181 ccttgcgggtg aaagcgaatt cctagacacc tggaacagag agacacactg ccaccagcac
241 aaatactgcg accccaacct agggcttcgg gtccagcaga agggcacctc agaaacagac
301 accatctgca cctgtgaaga aggctggcac tgtacgagtg aggcctgtga gagctgtgtc
361 ctgcaccgct catgctcgcc cggcttggg gtcaagcaga ttgctacagg ggtttctgat
421 accatctgcg agccctgccc agtcggcttc ttctcaatg tgtcatctgc ttctgaaaaa
481 tgtcacctt ggacaagctg tgagaccaa gacctggtg tgcaacaggc aggcacaaac
541 aagactgatg ttgtctgtgg tccccaggat cggctgagag ccttggtggt gatccccatc
601 atcttcggga tctgtttgc catcctcttg gtgctggtct ttatcaaaaa ggtggccaag
661 aagccaacca ataaggcccc ccacccaag caggaacccc aggagatcaa tttcccgac
721 gatcttctg gctccaacac tgctgtcca gtgcaggaga cttacatgg atgccaaccg
781 gtcaccagg aggatggcaa agagagtcgc atctcagtc aggagagaca gtga

```

FIGURA 4D

Isoforma larga codificada para CD40 humano:

```

1 mvrplqcvl wgclltavhp epptacrekq ylinsqccsl cpggqklvsd cteftetecl
61 pcgesefldt wnrethchqh kyedpnlgk vqkgktsetd tictceegwh ctseacescv
121 lhrscspgfg vkqiatgvsd ticepcpvgf fsnvssafek chpwtscetk dlvvqqagtn
181 ktdvvcgppd rlravvipi ifgilfaill vlvfikkvak kptnkaphpk qepqeinfpd
241 dlpgsntaap vqetlhgcqp vtqedgkesr isvqerq

```

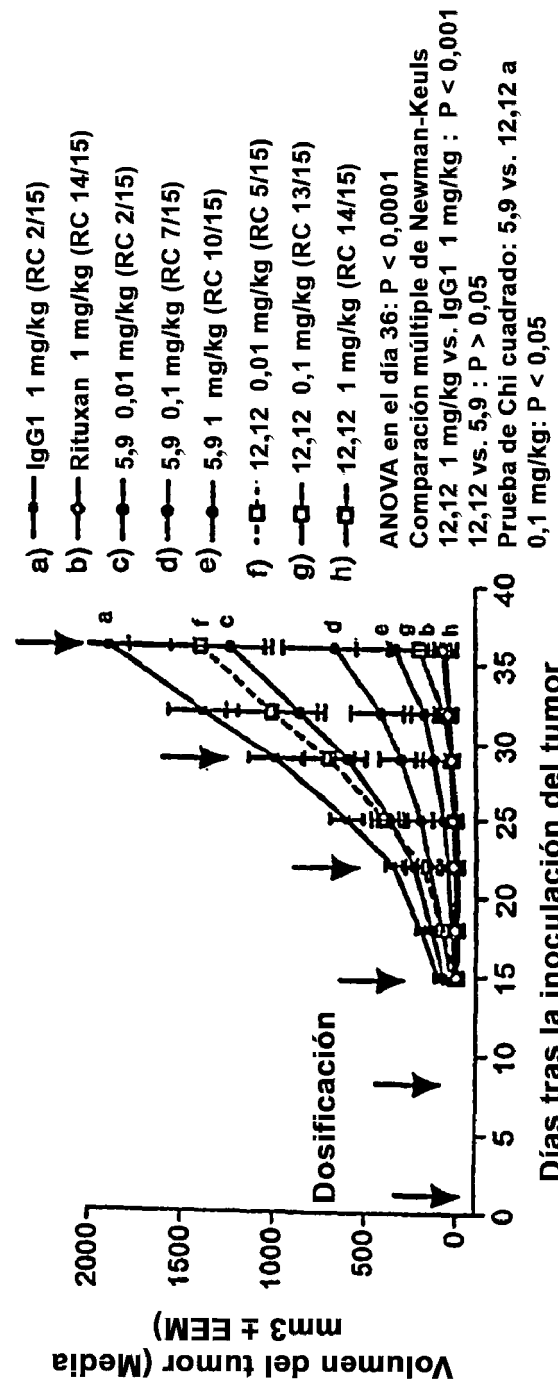
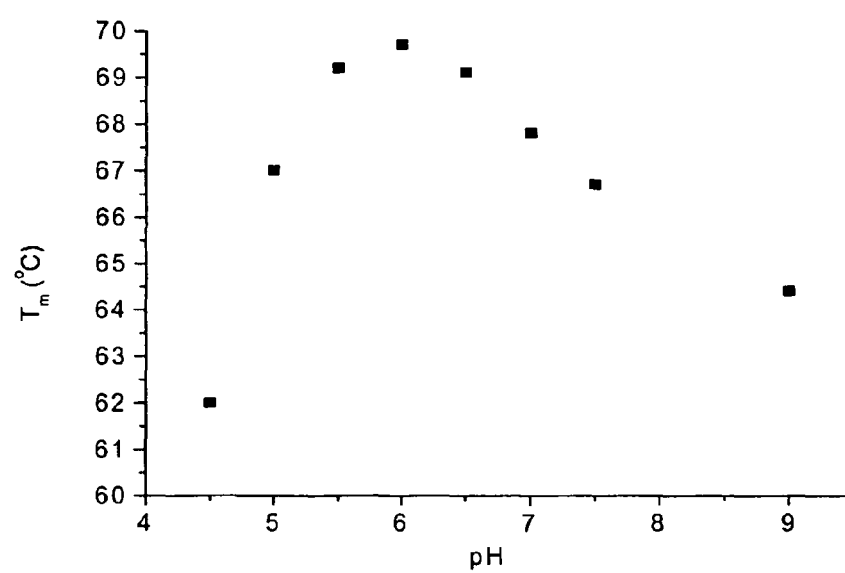


FIGURA 5

FIGURA 6



ES 2 346 977 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Hurst, Deborah
 Long, Li
 Luqman, Mohammad
 Lopes de Menezes, Daniel E.
 Yabannavar, Asha
 Zaror, Isabel
 <120> Procedimientos de terapia para cánceres que expresan el antígeno CD40
 <130> PP23220.001 (281250)
 <150> 60/565,710
 <151> 2004-04-27
 <150> 60/525,579
 <151> 2003-11-26
 <150> 60/517,337
 <151> 2003-11-04
 <160> 18
 <170> FastSEQ for Windows Versión 4.0
 <210> 1
 <211> 720
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia codificadora para la cadena ligera del anticuerpo anti CD40 CHIR-12.12 humano
 <221> CDS
 <222> (1)...(720)
 <400> 1

atg gcg ctc cct gct cag ctc ctg ggg ctg cta atg ctc tgg gtc tct 48
 Met Ala Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 gga tcc agt ggg gat att gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg acc 96
 Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Thr
 20 25 30
 gtc acc cct gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tcc agt cag agc 144
 Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35 40 45
 ctc ctg tat agt aat gga tac aac tat ttg gat tgg tac ctg cag aag 192
 Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60
 cca ggg cag tct cca cag gtc ctg atc tct ttg ggt tct aat cgg gcc 240
 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Val Leu Ile Ser Leu Gly Ser Asn Arg Ala
 65 70 75 80
 tcc ggg gtc cct gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt 288
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

ES 2 346 977 T3

	aca	ctg	aaa	atc	agc	aga	gtg	gag	gct	gag	gat	gtt	ggg	gtt	tat	tac	336
	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	
			100					105					110				
5	tgc	atg	caa	gct	cga	caa	act	cca	ttc	act	ttc	ggc	cct	ggg	acc	aaa	384
	Cys	Met	Gln	Ala	Arg	Gln	Thr	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	
			115					120					125				
10	gtg	gat	atc	aga	cga	act	gtg	gct	gca	cca	tct	gtc	ttc	atc	ttc	ccg	432
	Val	Asp	Ile	Arg	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	
			130				135						140				
15	cca	tct	gat	gag	cag	ttg	aaa	tct	gga	act	gcc	tct	gtt	gtg	tgc	ctg	480
	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	
	145					150					155					160	
20	ctg	aat	aac	ttc	tat	ccc	aga	gag	gcc	aaa	gta	cag	tgg	aag	gtg	gat	528
	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	
					165					170					175		
25	aac	gcc	ctc	caa	tcg	ggg	aac	tcc	cag	gag	agt	gtc	aca	gag	cag	gac	576
	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	
				180					185					190			
30	agc	aag	gac	agc	acc	tac	agc	ctc	agc	agc	acc	ctg	acg	ctg	agc	aaa	624
	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	
			195					200					205				
35	gca	gac	tac	gag	aaa	cac	aaa	gtc	tac	gcc	tgc	gaa	gtc	acc	cat	cag	672
	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	
			210				215						220				
40	ggc	ctg	agc	tcg	ccc	gtc	aca	aag	agc	ttc	aac	agg	gga	gag	tgt	tag	720
	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	*	
		225				230				235							

35

<210> 2

<211> 239

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera del anticuerpo anti CD40 CHIR-12.12 humano

<400> 2

50	Met	Ala	Leu	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Met	Leu	Trp	Val	Ser	
	1				5					10					15		
	Gly	Ser	Ser	Gly	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Thr	
				20					25					30			
55	Val	Thr	Pro	Gly	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	
			35				40						45				
	Leu	Leu	Tyr	Ser	Asn	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Asp	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	
		50				55					60						
	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Val	Leu	Ile	Ser	Leu	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	
60						70					75					80	
	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	
				85					90					95			
	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	
				100					105					110			
65	Cys	Met	Gln	Ala	Arg	Gln	Thr	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	
			115				120						125				
	Val	Asp	Ile	Arg	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	

ES 2 346 977 T3

```

130      135      140
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145      150      155      160
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
5      165      170      175
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180      185      190
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195      200      205
10 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210      215      220
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225      230      235

15 <210> 3
    <211> 2016
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial
20 <220>
    <223> Secuencia codificadora para la cadena pesada del anticuerpo anti CD40 CHIR-12.12 humano (con intrones)

25 <400> 3

    atggagtttg ggctgagctg ggttttcctt gttgctatgt taagaggtgt ccagtgtcag 60
    gtgcagtttg tggagtcttg gggaggcgtg gtccagcctg ggagggtccct gagactctcc 120
    tgtgcagcct ctggattcac cttcagtagc tatggcatgc actgggtccg ccagggtcca 180
30 ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tcatatgagg aaagtaatag ataccatgca 240
    gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagatcac gctgtatctg 300
    caaatgaaca gcctcagaac tgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag agatgggggt 360
    atagcagcac ctgggacctga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctccctcagca 420
    agtaccaagg gcccatccgt cttccccctg ggcgccgcta gcaagagcac ctctgggggc 480
35 acagcggccc tgggctgctt ggtcaaggac taactccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg 540
    aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtccctcagga 600
    ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 660
    atctgcaacg tgaatcacia gccacgaac acaaggtgg acaagagagt tgggtgagagg 720
    ccagcacagg gagggagggt gtctgctgga agccaggctc agcgtctctg cctggacgca 780
40 tcccggttat gcagtcccg tccagggcag caaggcaggc cccgtctgcc tcttcacccg 840
    gaggcctctg cccgccccac tcatgctcag ggagagggtc ttctggcttt tccccaggc 900
    tctgggcagg cacaggctag gtgcccctaa ccagggccct gcacacaaag gggcagggtgc 960
    tgggctcaga cctgccaaga gccatatccg ggaggaccct gcccctgacc taagcccacc 1020
    ccaaaggcca aactctccac tccctcagct cggacacctt ctctctctcc agattccagt 1080
45 aactcccaat cttctctctg cagagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc 1140
    gtgcccaggt aagccagccc aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca ggtgccctag 1200
    agtagcctgc atccagggac aggccccagc cgggtgctga cacgtccacc tccatctctt 1260
    cctcagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaacccaagg 1320
    acacctcat gatctcccg acccctgagg tcacatgctt ggtggtggac gtgagccacg 1380
50 aaagccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga 1440
    caaagccgag ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc 1500
    tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc 1560
    cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggtg gaccctggg gtgcgagggc 1620
55 cacatggaca gaggccggct cggcccaccc tctgccctga gagtgaccgc tgtaccaacc 1680
    tctgtcccta cagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag 1740
    gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1800
    atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1860
    gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1920
60 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtctctga caaccactac 1980
    acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatga 2016

    <210> 4
65 <211> 469
    <212> PRT

```

ES 2 346 977 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada del anticuerpo anti CD40 CHIR-12.12 humano

5

<400> 4

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

ES 2 346 977 T3

<210> 5
 <211> 469
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena pesada de la variante del anticuerpo anti CD40 CHIR-12.12 humano
 10 <400> 5

```

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

ES 2 346 977 T3

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460
 Leu Ser Pro Gly Lys
 465

15 <210> 6
 <211> 239
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena ligera del anticuerpo anti CD40 CHIR-5.9 humano
 25 <400> 6

Met Ala Leu Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Ser Gly Ala Ile Val Met Thr Gln Pro Pro Leu Ser Ser Pro
 20 25 30
 Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35 35 40 45
 Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg
 50 55 60
 Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Phe Phe Arg Arg Leu
 65 70 75 80
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Met Gln Val Thr Gln Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg
 115 120 125
 Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140
 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

60 <210> 7
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Cadena pesada del anticuerpo anti CD40 CHIR-5.9 humano

ES 2 346 977 T3

<400> 7

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

60 <210> 8

<211> 474

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65

<220>

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

ES 2 346 977 T3

<400> 8

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

<210> 9

<211> 612

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

ES 2 346 977 T3

<220>

<221> característica miscelánea

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

5 <223> Secuencia codificadora para la isoforma corta del CD40 humano

<221> CDS

<222> (1)...(612)

10 <400> 9

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

ES 2 346 977 T3

<210> 10

<211> 203

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

10

15

20

25

30

35

```

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

```

40

<210> 11

<211> 834

<212> ADN

45 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> característica miscelánea

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

50 <223> Secuencia codificadora para la isoforma larga del CD40 humano

<221> CDS

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

55

60

65

ES 2 346 977 T3

<400> 11

5	atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctc tgg ggc tgc ttg ctg acc	48
	Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr	
	1 5 10 15	
10	gct gtc cat cca gaa cca ccc act gca tgc aga gaa aaa cag tac cta	96
	Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu	
	20 25 30	
15	ata aac agt cag tgc tgt tct ttg tgc cag cca gga cag aaa ctg gtg	144
	Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val	
	35 40 45	
20	agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc ctt cct tgc ggt gaa	192
	Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu	
	50 55 60	
25	agc gaa ttc cta gac acc tgg aac aga gag aca cac tgc cac cag cac	240
	Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His	
	65 70 75 80	
30	aaa tac tgc gac ccc aac cta ggg ctt cgg gtc cag cag aag ggc acc	288
	Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr	
	85 90 95	
35	tca gaa aca gac acc atc tgc acc tgt gaa gaa ggc tgg cac tgt acg	336
	Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr	
	100 105 110	
40	agt gag gcc tgt gag agc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tcg ccc ggc	384
	Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly	
	115 120 125	
45	ttt ggg gtc aag cag att gct aca ggg gtt tct gat acc atc tgc gag	432
	Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu	
	130 135 140	
50	ccc tgc cca gtc ggc ttc ttc tcc aat gtg tca tct gct ttc gaa aaa	480
	Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys	
	145 150 155 160	
55	tgt cac cct tgg aca agc tgt gag acc aaa gac ctg gtt gtg caa cag	528
	Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln	
	165 170 175	
60	gca ggc aca aac aag act gat gtt gtc tgt ggt ccc cag gat cgg ctg	576
	Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu	
	180 185 190	
65	aga gcc ctg gtg gtg atc ccc atc atc ttc ggg atc ctg ttt gcc atc	624
	Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile	
	195 200 205	
70	ctc ttg gtg ctg gtc ttt atc aaa aag gtg gcc aag aag cca acc aat	672
	Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn	
	210 215 220	
75	aag gcc ccc cac ccc aag cag gaa ccc cag gag atc aat ttt ccc gac	720
	Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp	
	225 230 235 240	

ES 2 346 977 T3

```

gat ctt cct ggc tcc aac act gct gct cca gtg cag gag act tta cat 768
Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His
245 250 255

5 gga tgc caa ccg gtc acc cag gag gat ggc aaa gag agt cgc atc tca 816
Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser
260 265 270

10 gtg cag gag aga cag tga 834
Val Gln Glu Arg Gln *
275

15 <210> 12
<211> 277
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens

<400> 12

25

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

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

```

ES 2 346 977 T3

<210> 13
 <211> 459
 <212> ADN
 5 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> característica misc.
 10 <222> (0)...(0)
 <223> Precursor de la IL-2 humana
 <221> CDS
 <222> (1)...(459)
 15 <400> 13

20
 atg tac agg atg caa ctc ctg tct tgc att gca cta agt ctt gca ctt 48
 Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 25
 gtc gca aac agt gca cct act tca agt tct aca aag aaa aca cag cta 96
 Val Ala Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
 20 25 30
 30
 caa ctg gag cat tta ctg ctg gat tta cag atg att ttg aat gga att 144
 Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
 35 40 45
 35
 aat aat tac aag aat ccc aaa ctc acc agg atg ctc aca ttt aag ttt 192
 Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
 50 55 60
 40
 tac atg ccc aag aag gcc aca gaa ctg aaa cat ctt cag tgt cta gaa 240
 Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
 65 70 75 80
 45
 gaa gaa ctc aaa cct ctg gag gaa gtg cta aat tta gct caa agc aaa 288
 Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
 85 90 95
 50
 aac ttt cac tta aga ccc agg gac tta atc agc aat atc aac gta ata 336
 Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
 100 105 110
 55
 gtt ctg gaa cta aag gga tct gaa aca aca ttc atg tgt gaa tat gct 384
 Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
 115 120 125
 60
 gat gag aca gca acc att gta gaa ttt ctg aac aga tgg att acc ttt 432
 Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
 130 135 140
 65
 tgt cag agc atc atc tca aca ctg act 459
 Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 145 150

65 <210> 14
 <211> 153

ES 2 346 977 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 14

```

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

```

35

<210> 15

<211> 399

40 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> característica misc.

45 <222> (0)...(0)

<223> IL-2 humana madura

<221> CDS

50 <222> (1)...(399)

55

60

65

ES 2 346 977 T3

<400> 15

5	gca cct act tca agt tct aca aag aaa aca cag cta caa ctg gag cat	48
	Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His	
	1 5 10 15	
10	tta ctg ctg gat tta cag atg att ttg aat gga att aat aat tac aag	96
	Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys	
	20 25 30	
15	aat ccc aaa ctc acc agg atg ctc aca ttt aag ttt tac atg ccc aag	144
	Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys	
	35 40 45	
20	aag gcc aca gaa ctg aaa cat ctt cag tgt cta gaa gaa gaa ctc aaa	192
	Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys	
	50 55 60	
25	cct ctg gag gaa gtg cta aat tta gct caa agc aaa aac ttt cac tta	240
	Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu	
	65 70 75 80	
30	aga ccc agg gac tta atc agc aat atc aac gta ata gtt ctg gaa cta	288
	Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu	
	85 90 95	
35	aag gga tct gaa aca aca ttc atg tgt gaa tat gct gat gag aca gca	336
	Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala	
	100 105 110	
40	acc att gta gaa ttt ctg aac aga tgg att acc ttt tgt cag agc atc	384
	Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile	
	115 120 125	
45	atc tca aca ctg act	399
	Ile Ser Thr Leu Thr	
	130	

<210> 16

<211> 133

50 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55

60

65

ES 2 346 977 T3

<400> 16

```

5      Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
      1          5          10          15
      Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
      20          25          30
10     Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
      35          40          45
      Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
      50          55          60
15     Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
      65          70          75          80
      Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
      85          90          95
      Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
      100          105          110
20     Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
      115          120          125
      Ile Ser Thr Leu Thr
25     130

```

30 <210> 17

<211> 396

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> muteína de IL-2 des-alanil 1, C125S humana

<221> CDS

40 <222> (1)...(396)

45

50

55

60

65

ES 2 346 977 T3

<400> 17

```

      cct act tca agt tct aca aag aaa aca cag cta caa ctg gag cat tta 48
      Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
5      1          5          10          15

      ctg ctg gat tta cag atg att ttg aat gga att aat aat tac aag aat 96
      Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
      20          25          30

10     ccc aaa ctc acc agg atg ctc aca ttt aag ttt tac atg ccc aag aag 144
      Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
      35          40          45

15     gcc aca gaa ctg aaa cat ctt cag tgt cta gaa gaa gaa ctc aaa cct 192
      Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
      50          55          60

20     ctg gag gaa gtg cta aat tta gct caa agc aaa aac ttt cac tta aga 240
      Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
      65          70          75          80

25     ccc agg gac tta atc agc aat atc aac gta ata gtt ctg gaa cta aag 288
      Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
      85          90          95

30     gga tct gaa aca aca ttc atg tgt gaa tat gct gat gag aca gca acc 336
      Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
      100          105          110

35     att gta gaa ttt ctg aac aga tgg att acc ttt tct cag agc atc atc 384
      Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
      115          120          125

35     tca aca ctg act
      Ser Thr Leu Thr
      130

```

<210> 18

40 <211> 132

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> muteína IL-2 des-alanil 1, C125S humana

<400> 18

```

50     Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
      1          5          10          15
      Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
      20          25          30
55     Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
      35          40          45
      Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
      50          55          60
      Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
      65          70          75          80
60     Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
      85          90          95
      Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
      100          105          110
      Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
      115          120          125
65     Ser Thr Leu Thr
      130

```