



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 346 978**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04818358 .6**

96 Fecha de presentación : **04.11.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1684805**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.08.2006**

54 Título: **Uso de anticuerpos monoclonantes anti-CD40 antagonistas para el tratamiento del mieloma múltiple.**

30 Prioridad: **04.11.2003 US 517337 P**
26.11.2003 US 525579 P
26.04.2004 US 565709 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 y
Zaror, Isabel

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 346 978 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

Uso de anticuerpos monoclonales anti-CD40 antagonistas para el tratamiento del mieloma múltiple.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a procedimientos para el tratamiento del mieloma múltiple usando anticuerpos monoclonales anti CD40 antagonistas.

10 **Antecedentes de la invención**

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia maligna de células B que se caracteriza por la acumulación latente en la médula ósea de células plasmáticas secretoras con un índice de proliferación bajo y un ciclo de vida extendido. En última instancia, la enfermedad ataca a los huesos y a la médula ósea, y tiene como resultado múltiples tumores y lesiones a lo largo de todo el sistema esquelético. Aproximadamente un 1% de todos los cánceres, y ligeramente más del 10% de todas las neoplasias malignas hematológicas, se puede atribuir al mieloma múltiple. La incidencia del MM aumenta en la población anciana, con una mediana de edad en el momento del diagnóstico de aproximadamente 61 años. Los protocolos terapéuticos anteriores, que incluyen una combinación de agentes quimioterapéuticos, tales como vincristina, BCNU, melfalán, ciclofosfamida, adriamicina y prednisona o dexametasona, dan un índice de remisión completa de únicamente aproximadamente 5% y la mediana de la supervivencia es de aproximadamente 36-48 meses desde el momento del diagnóstico. Los recientes avances usando quimioterapia de dosis elevadas seguido por el trasplante autólogo de médula ósea o de células madre de sangre periférica (PBMC) han aumentado el índice de remisión completa y la duración de la remisión. No obstante, la supervivencia global sólo se ha prolongado ligeramente y no se han obtenidos pruebas de una curación. En última instancia, todos los pacientes de MM recaen, incluso con una terapia de mantenimiento con interferón alfa (IFN- α) solo o en combinación con esteroides.

La eficacia de los regímenes terapéuticos quimioterapéuticos disponibles para el MM está limitada por el bajo índice de proliferación celular y el desarrollo de resistencias a múltiples fármacos. Para más del 90% de los pacientes de MM, la enfermedad se convierte en quimiorresistente. Como resultado, se están buscando regímenes terapéuticos alternativos apuntan a inmunoterapia dirigida a antígenos de superficie como el CD20 y el CD40 sobre las células plasmáticas.

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, células presentadoras de antígenos (APC), células endoteliales, células monocíticas y células epiteliales. La unión del ligando de CD40 al antígeno CD40 en la superficie de la célula B estimula la célula B, causando la maduración de la célula B a una célula plasmática que secreta altos niveles de inmunoglobulinas solubles. 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. Por tanto, 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, leucemia mieloblástica y enfermedad de Hodgkin expresan el antígeno CD40. Es importante el hecho de que el CD40 se encuentra en un mayor porcentaje de mielomas múltiples en comparación con el CD20 (Maloney y col. (1999) Semin. Hematol. 36 (Suppl. 3): 30-33).

Dado el mal pronóstico de los pacientes de mieloma múltiple se necesitan protocolos de tratamiento alternativos.

Los documentos WO 01/83755 y WO 02/28480 describen anticuerpos capaces de unirse al CD40, procedimientos para producir estos anticuerpos y procedimientos para su uso.

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

Breve resumen de la invención

La invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-CD40 humano que es capaz de unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expresado sobre la superficie de una célula que expresa CD40 humano, en el que dicho anticuerpo monoclonal está exento de actividad agonista significativa, de modo que, cuando dicho anticuerpo monoclonal se une al antígeno CD40 expresado sobre la superficie de dicha célula se inhibe el crecimiento o diferenciación de dicha célula, para usar en un procedimiento para tratar a un sujeto humano por mieloma múltiple, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo monoclonal anti CD40 humano, en el que dicho anticuerpo monoclonal anti CD40 humano se selecciona del grupo constituido por:

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

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

ES 2 346 978 T3

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

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

La invención también proporciona un anticuerpo monoclonal anti-CD40 humano que es capaz de unirse específicamente al antígeno CD40 humano, en el que dicho anticuerpo monoclonal está exento de actividad agonista cuando se une al antígeno CD40, para usar en un procedimiento para inhibir el crecimiento de las células de mieloma múltiple que expresan antígeno CD40, en el que dicho procedimiento comprende poner en contacto dichas células con una cantidad eficaz del anticuerpo monoclonal anti CD40 humano, en el que dicho anticuerpo monoclonal anti CD40 humano se selecciona del, grupo constituido por:

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

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

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

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

La invención también proporciona el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal que es capaz de unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expresado sobre la superficie de una célula que expresa CD40 humano a en la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto humano por mieloma múltiple, en el que dicho, anticuerpo monoclonal está exento de actividad agonista significativa, de modo que, cuando dicho anticuerpo monoclonal se une al antígeno CD40 expresado sobre la superficie de dicha célula se inhibe el crecimiento o diferenciación de dicha célula, en el que dicho anticuerpo monoclonal anti CD40 humano se selecciona del, grupo constituido por:

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

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

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

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

La invención también proporciona el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 humano que es capaz de unirse específicamente a un antígeno CD40 en la fabricación de un medicamento para inhibir el crecimiento de células de mieloma múltiple que expresan el antígeno CD40, en el que dicho anticuerpo monoclonal está exento de actividad agonista significativa cuando está unido al antígeno CD40, en el que dicho anticuerpo monoclonal anti CD40 humano se selecciona del, grupo constituido por:

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

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

ES 2 346 978 T3

c) un anticuerpo monoclonal, que se une a un epítopo 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

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

10 La invención también proporciona un procedimiento *in vitro* para inhibir el crecimiento de células de mieloma múltiple que expresan antígeno CD40, en el que dicho procedimiento comprende poner en contacto dichas células con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 humano que es capaz de unirse específicamente a dicho antígeno CD40, en el que dicho anticuerpo monoclonal está exento de actividad agonista significativa cuando está unido al antígeno CD40, en el que dicho anticuerpo se selecciona del grupo constituido por:

15 a) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo 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;

20 b) un anticuerpo monoclonal, que se une a un epítopo 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 monoclonal, que se une a un epítopo 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

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

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

Breve resumen de la divulgación

35 Se divulgan procedimientos de tratar un sujeto humano con mieloma múltiple, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo anti CD40 o un fragmento de unión a antígeno del mismo que está exento de actividad agonista significativa cuando está unido a un antígeno CD40 sobre una célula humana que expresa CD40. También se divulgan procedimientos para inhibir el crecimiento de células de mieloma múltiple que expresan el antígeno CD40.

40 Los anticuerpos anti CD40 antagonistas para usar en los procedimientos divulgados en el presente documento tienen una fuerte afinidad por CD40 y se caracterizan por tener una constante de equilibrio de disociación (K_D) de al menos 10^{-6} M, de preferencia al menos 10^{-7} M hasta aproximadamente 10^{-8} M, de más preferencia al menos aproximadamente 10^{-8} M hasta aproximadamente 10^{-12} M. Estos anticuerpos monoclonales y sus fragmentos de unión al antígeno son capaces de unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expresado en la superficie de una célula humana. Están exentos de actividad agonista significativa pero exhiben actividad antagonista cuando se unen al antígeno CD40 en las células humanas. En una forma de realización, el anticuerpo anti CD40 o su fragmento exhibe actividad antagonista cuando se une al antígeno CD40 en células B humanas normales. En otra forma de realización, el anticuerpo anti CD40 o su fragmento exhibe actividad antagonista cuando se une al antígeno CD40 en células B malignas humanas. Los anticuerpos monoclonales adecuados tienen regiones humanas constantes; de preferencia tienen también regiones del marco total o parcialmente humanizadas; y de mayor preferencia son anticuerpos completamente humanos o sus fragmentos de unión al antígeno.

Ejemplos de tales anticuerpos monoclonales 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 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 SEQ ID N° 1 y SEC ID N° 3; y los fragmentos de estos anticuerpos monoclonales de unión a 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 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 en un ensayo de unión competitiva; y un anticuerpo monoclonal que es un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o cualquiera de los anteriores anticuerpos monoclonales, en los que el fragmento retiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno CD40 humano.

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

Los anticuerpos antagonistas anti CD40 identificados en el presente documento como adecuados para uso en los procedimientos dados a conocer en el presente documento pueden modificarse. Las modificaciones de estos anticuerpos antagonistas anti CD40 incluyen, entre otros, anticuerpos anti CD40 quiméricos inmunológicamente activos, anticuerpos anti CD40 humanizados y anticuerpos anti CD40 murinos inmunológicamente activos antagonista anti CD40 o sus fragmentos de unión al antígeno.

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).

La Figura 5 demuestra la actividad antitumoral potenciada *in vivo* del tratamiento de combinación con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 y bortezomib (VELCADE® usando un modelo de xenoinjerto IM-9 de mieloma múltiple humano).

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

“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.

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, mieloma múltiple y leucemia.

ES 2 346 978 T3

Los “anticuerpos” y las “inmunoglobulinas” (Ig) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos exhiben especificidad de unión a un antígeno, Las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a los anticuerpos que carecen de especificidad antigénica. Los polipéptidos de este último tipo se producen, por ejemplo, a niveles bajos en el sistema linfático y son producidos por los mielomas a niveles elevados.

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) y péptidos recombinantes que comprenden los anteriores.

El término “anticuerpo monoclonal” 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.

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 y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo concreto para su antígeno concreto. 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, conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan la estructura de la lámina β. 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 26-32 (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.

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. En una especie de Fv de dos cadenas, esta región está constituida por un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en estrecha asociación no covalente. En una especie Fv de una cadena, un dominio variable de la cadena pesada y uno de la cadena ligera pueden estar unidos de forma covalente mediante un péptido ligador flexible de modo que las cadenas pesadas y ligeras se puedan asociar en una estructura dimérica análoga a la de la especie Fv de dos cadenas, En esta configuración, las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para

ES 2 346 978 T3

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.

5

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 F(ab')₂ de anticuerpos se produjeron originariamente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

10

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.

15

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

25

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.

30

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.

35

"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 (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

40

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 transfecionado. 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.

55

"Células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y que realizan funciones efectoras. De preferencia, las células expresan al menos Fc γ RIII y llevan a cabo la función efectora de citotoxicidad mediada por células dependiente de antígenos (ADCC). 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.

65

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 (1994)).

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

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

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

La presente descripción se refiere a composiciones y procedimientos para el tratamiento de sujetos humanos con mieloma múltiple.

Los procedimientos implican el tratamiento con un anticuerpo anti CD40 descrito en el presente documento, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, en los que la administración del anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno promueve una respuesta terapéutica positiva en el paciente que se somete a este procedimiento de terapia. Los anticuerpos anti CD40 adecuados para uso en los procedimientos de la invención se unen específicamente al antígeno CD40 humano expresado en la superficie de una célula humana y están exentos de actividad agonista significativa, pero exhiben actividad antagonista cuando se unen al antígeno CD40 en una célula humana que expresa CD40, como se demuestra para las células B humanas normales y neoplásicas que expresan CD40. Estos anticuerpos anti CD40 y sus fragmentos de unión al antígeno se denominan en el presente documento anticuerpos anti CD40 antagonistas. Tales anticuerpos incluyen, entre otros, los anticuerpos monoclonales 5.9 y CHIR-12.12 totalmente humanos que se describen a continuación y los anticuerpos monoclonales tienen las características de unión de los anticuerpos monoclonales 5.9 y CHIR-12.12. Estos anticuerpos monoclonales que se han producido de manera recombinante se describen más adelante.

ES 2 346 978 T3

Los anticuerpos que tienen las características de unión de los anticuerpos monoclonales 5.9 y CHIR-12.12 incluyen los anticuerpos que interfieren de manera competitiva con la unión a CD40 y/o se unen a los mismos epítomos que 5.9 y CHIR-12.12. 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.

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

Anticuerpos anti CD40 antagonistas

Los anticuerpos monoclonales 5.9 y CHIR-12.12 representan anticuerpos anti CD40 antagonistas adecuados para uso en los procedimientos del presente documento. Los anticuerpos 5.9 y 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). Los 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.

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 1A y 1B, 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 2A y 2B, 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 5.9 se presentan en las Figuras 3A y 3B, respectivamente. Véase también SEC ID N° 6 (secuencia completa para la cadena ligera del mAb 5.9), SEC ID N° 7 (secuencia completa para la cadena pesada del mAb 5.9) y SEC ID N° 8 (secuencia completa para una variante de la cadena pesada del mAb 5.9 presentada en SEC ID N° 7, donde la variante comprende una sustitución del residuo alanina por serina en la posición de 158 de SEC ID N° 7). Además, los hibridomas que expresan los anticuerpos 5.9 y 12.12 se han depositado en la ATCC con una denominación de depósito de patente de PTA-5542 y PTA-5543, respectivamente.

Además de la actividad antagonista, resulta de preferencia que los anticuerpos anti CD40 de esta invención tengan otro mecanismo de acción contra una célula tumoral. Por ejemplo, los anticuerpos 5.9 y CHIR-12.12 nativos tienen actividad ADCC. Como alternativa, las regiones variables de los anticuerpos 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 5.9 o CHIR-12.12 que se unen al antígeno a una citotoxina.

Los anticuerpos monoclonales 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 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, 5.9 y CHIR-12.12 actúan como anticuerpos anti CD40 antagonistas. Además, 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.

ES 2 346 978 T3

Se entiende por “antígeno CD40”, “antígeno CD40 de superficie celular”, “receptor de CD40” o “CD40” una glicoproteína transmembrana 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 conocido en una célula e inicia una reacción o actividad que es similar a la misma que se inicia por el ligando natural del receptor. Por ejemplo, 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. Por ejemplo, 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.

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

Como se usa en el presente documento “anticuerpo anti CD40” abarca cualquier anticuerpo que reconoce específicamente el antígeno CD40 de superficie celular, incluidos anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales,

anticuerpos de cadena única y sus fragmentos tales como Fab, F(ab')₂, F_v, y otros fragmentos que retienen la función de unión al antígeno del anticuerpo anti CD40 original. Son de particular interés para la presente invención los anticuerpos anti CD40 que comparten las características de unión de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos en lo que antecede. 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° 2 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. Los expertos en la técnica reconocen que los anticuerpos antagonistas y sus fragmentos de unión a antígeno de estos anticuerpos divulgados en el presente documento incluyen anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígeno que se producen de forma recombinante usando procedimientos bien conocidos en la técnica y que se describen en el presente documento más adelante e incluyen por ejemplo, anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 que se han producido de forma recombinante.

30 *Producción de anticuerpos anti CD40 antagonistas*

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

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

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

De preferencia, el anticuerpo es monoclonal en la naturaleza. Por "anticuerpo monoclonal" se entiende un anticuerpo obtenido de una población 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. El término no está limitado a la especie o fuente del anticuerpo. El término abarca inmunoglobulinas enteras así como fragmentos tales como Fab, F(ab')₂, F_v, y otros que retienen la función de unión al antígeno del anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico, es decir, el antígeno CD40 de superficie celular. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo ya que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que es necesaria la producción del anticuerpo por ningún

procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilizan según la presente invención pueden obtenerse por el procedimiento de hibridomas descrito por primera vez por Kohler y col. (1975) Nature 256: 495, o pueden producirse por los procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Patente de EEUU N° 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” pueden aislarse también de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson y col. (1991) Nature 352: 624-628; Marks y col. (1991) J Mol. Biol. 222: 581-597; y en la Patente de EEUU N° 5.514.548.

Por “epítipo” se entiende la parte de la molécula antigénica para la que se produce un anticuerpo y a la que se unirá el anticuerpo. Los epítipos pueden comprender residuos lineales de aminoácidos (es decir, los residuos en el epítipo están organizados consecutivamente uno después de otro en forma lineal), residuos no lineales (a los que se hace referencia en el presente documento como “epítipos no lineales”; estos epítipos 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 siembran en placas 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 transfeccionan 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 Chikthun (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 transfecciona con vectores capaces de expresar una cadena ligera y una cadena pesada, respectivamente. Transfeccionando las dos proteínas en vectores separados, pueden producirse anticuerpos quiméricos. Otra ventaja es la glicosilación correcta del anticuerpo.

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

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

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

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

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

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

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

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 fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos anti CD40 antagonistas divulgados en el presente documento también se pueden conjugar con una citotoxina para matar las células cancerosas diana, tal como se describe más adelante en el presente documento.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos generadas usando las técnicas descritas en, por ejemplo, McCafferty y col. (1990) *Nature* 348: 552-554 (1990) y en la Patente 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 la presente invención incluyen los anticuerpos monoclonales 5.9 y CHIR 12.12 dados a conocer en el presente documento, así como los anticuerpos que difieren de estos anticuerpos pero que retienen las CDR; y los anticuerpos con una o más adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos, 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.

5 Los anticuerpos de la presente invención pueden tener variaciones de secuencia producidas usando los procedimientos descritos en, por ejemplo, los documentos 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 MHC 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
10 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.

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

30 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.
40 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.

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

65 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 Srivagtava 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 capacidad para convertir 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) en un pigmento azul, cuantificable con un espectrofotómetro. “Pareja de unión específica” se refiere a una proteína capaz de unirse a una molécula de ligando con alta especificidad, como por ejemplo en el caso de un antígeno y un anticuerpo monoclonal específico para éste. Otras parejas de unión específica incluyen biotina y avidina o estreptavidina, IgG y proteína A, y las numerosas parejas de receptor-ligando conocidas en la técnica. Debería entenderse que la descripción anterior no pretende categorizar los diversos marcadores en diferentes clases, ya que el mismo marcador puede servir en varios modos diferentes. Por ejemplo, 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, citochalasin B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y sus análogos y homólogos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), 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 de anticuerpos anti CD40 antagonistas

En la presente invención se pueden usar variantes biológicamente activas de los anticuerpos anti CD40 antagonistas adecuadas. Dichas variantes retendrán las propiedades de unión deseadas del 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 5.9 o CHIR-12.12 descrito 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 y Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, Nueva York); Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488-492; Kunkel y col. (1987) *Methods Enzymol.* 154: 367-382; Sambrook y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, Nueva York); Patente de EEUU N° 4.873.192; y las referencias citadas en la misma. En el modelo de Dayhoff y col. (1978) en *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.) puede encontrarse orientación para sustituciones adecuadas de aminoácidos que no afectan la actividad biológica del polipéptido de interés. Las sustituciones conservadoras, tales como los intercambios de un aminoácido con otro que tiene propiedades similares, pueden ser de preferencia. Los ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen, pero no se limitan a, Gly \leftrightarrow Ala, Val \leftrightarrow Ile \leftrightarrow Leu, Asp \leftrightarrow Glu, Lys \leftrightarrow Arg, Asn \leftrightarrow Gln y Phe \leftrightarrow Trp \leftrightarrow Tyr.

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

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

De preferencia, las variantes de un anticuerpo anti CD40 antagonista de referencia tienen secuencias de aminoácidos que tienen al menos 70% o 75% de homología de secuencia, de preferencia al menos 80% u 85% de homología de 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 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 anti CD40, un experto en la técnica puede determinar fácilmente qué modificaciones a la secuencia de nucleótidos o aminoácidos de la proteína nativa darán como resultado una variante que sea adecuada para uso como un componente terapéuticamente activo de una composición farmacéutica utilizada en los procedimientos dados a conocer en el presente documento.

Procedimientos de terapia usando los anticuerpos anti CD40 antagonistas

Los procedimientos dados a conocer en el presente documento están dirigidos al uso de anticuerpos anti CD40 antagonistas para tratar sujetos (es decir, pacientes) que tienen mieloma múltiple, en el que las células de este cáncer expresan el antígeno CD40. Por “célula de mieloma múltiple que expresa CD40” se entiende las células de mieloma múltiple que expresan el antígeno CD40. El tratamiento con éxito del mieloma múltiple depende de lo avanzado del cáncer en el momento del diagnóstico y de si el sujeto se ha sometido o se va a someter a otros procedimientos de terapia en combinación con administración del anticuerpo anti-CD40.

Se pueden usar numerosos criterios para clasificar la etapa del mieloma múltiple. Los procedimientos divulgados en el presente documento se pueden utilizar para tratar mielomas múltiples clasificados de acuerdo con el sistema de clasificación de Durie-Salmon, que incluye tres etapas. De acuerdo con este sistema de clasificación, un sujeto con mieloma múltiple en estadio I tiene un “componente M” bajo, sin signos de anemia ni hipercalcemia, sin lesiones óseas según revelan las radiografías o sólo una lesión. Por “componente M” se entiende la presencia de sobreabundancia de un tipo de inmunoglobulina. A medida que el mieloma múltiple progresa, un sujeto desarrolla un componente M alto de anticuerpos IgA o IgG, y niveles bajos de otras inmunoglobulinas. El estadio II representa un estado intermedio, más avanzado que el estadio I pero todavía sin las características del estadio III. El tercer estadio se alcanza cuando se detecta uno de los siguientes: hipercalcemia, anemia, lesiones óseas múltiples o componente M elevado.

El sistema de clasificación de Durie-Salmon se puede combinar con mediciones de los niveles de creatinina para proporcionar una caracterización más precisa del estado de la enfermedad. Los niveles de creatinina en los sujetos de mieloma múltiple clasifican como “A” o “B”, en el que un resultado “B” indica un peor pronóstico que “A”. “B” indica mayores niveles de creatinina y fallo de la función renal. De ese modo, un caso de “Estadio IA” del mieloma múltiple indicaría ausencia de anemia, hipercalcemia u otros síntomas, combinado con niveles bajos de creatinina. Como otro medio para evaluar el pronóstico, estos criterios anteriores se pueden utilizar en combinación con la monitorización del nivel en sangre de la beta-2-microglobulina, producida por las células del mieloma múltiple. Niveles altos de la proteína indican que las células cancerosas están presentes en grandes cantidades.

Los procedimientos dados a conocer en el presente documento son aplicables al tratamiento del mieloma múltiple clasificado de acuerdo con cualquiera de los criterios anteriores. Del mismo modo que estos criterios se pueden utilizar para caracterizar estadios progresivos de la enfermedad, estos mismos criterios, es decir anemia, hipercalcemia, niveles de creatinina y niveles de beta-2-microglobulina, número de lesiones óseas y componente M, se pueden monitorizar para evaluar la eficacia del tratamiento.

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, donde el sujeto tiene mieloma múltiple, en el que el objetivo es curar, sanar, calmar, aliviar, alterar, remediar, atenuar, mejorar o afectar al mieloma múltiple, cualquier síntoma asociado con el mieloma múltiple o la predisposición hacia el desarrollo de mieloma múltiple. Por “tratamiento” también se entiende la aplicación o administración de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CD40 antagonista o sus fragmentos a un sujeto, o aplicación o administración de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CD40 antagonista o sus fragmentos a un tejido o línea celular aislados de un sujeto, que tiene mieloma múltiple, síntoma asociado con el mieloma múltiple o la predisposición hacia el desarrollo de mieloma múltiple, en el que el objetivo es curar, sanar, calmar, aliviar, alterar, remediar, atenuar, mejorar o afectar al mieloma múltiple, cualquier síntoma asociado con el mieloma múltiple o la predisposición hacia el desarrollo de mieloma múltiple.

Por “actividad antitumoral” se entiende una reducción en el índice de proliferación o acumulación de células malignas que expresan CD40 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) existentes o de células neoplásicas recién formadas, y, por tanto, una disminución del tamaño global de un tumor durante la terapia. La terapia con al menos un anticuerpo anti-CD40 antagonista (o un fragmento de unión a antígeno del mismo) produce una respuesta fisiológica que es beneficiosa con respecto al tratamiento del mieloma múltiple, en el que la enfermedad comprende células que expresan el antígeno CD40. Se reconoce que los procedimientos divulgados en el presente documento pueden ser útiles en la prevención de proliferación y sobrecrecimientos posteriores de células de mieloma múltiple que surgen durante la terapia.

ES 2 346 978 T3

De conformidad con los procedimientos dados a conocer en el presente documento, al menos un anticuerpo anti CD40 antagonista, (o su fragmento de unión al antígeno), tal como se define en otras partes en el presente documento se utiliza para estimular una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento o prevención del mieloma múltiple. Por “respuesta terapéutica positiva” con respecto al tratamiento del cáncer se entiende una mejora en la enfermedad asociada con la actividad antitumoral de estos anticuerpos o sus fragmentos y/o una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad. Es decir, se puede observar un efecto antiproliferativo, la prevención de otros sobrecrecimientos tumorales, una reducción del tamaño del tumor, una reducción en la cantidad de células cancerosas y/o una disminución en uno o más síntomas mediados por la estimulación de células que expresan CD40. 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. 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.

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

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

Los anticuerpos anti CD40 antagonistas pueden usarse en combinación con quimioterapéuticos conocidos, solos o en combinación con transpante de médula ósea, radioterapia, esteroides e interferón alfa para el tratamiento del mieloma múltiple. De este modo, los anticuerpos anti CD40 antagonistas descritos en el presente documento, o sus fragmentos de unión a antígeno, se administran en combinación con al menos otra terapia contra el cáncer, incluida, entre otras, radioterapia, quimioterapia, terapia con interferón alfa o terapia con esteroides, en la que la terapia anticancerosa adicional se administra antes, durante o después de la terapia con anticuerpo anti CD40. Por tanto, cuando las terapias combinadas comprenden la administración de un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno en combinación con la administración de otro agente terapéutico, como con quimioterapia, terapia de radiación o terapia con interferón alfa y/o esteroides, 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, en el que, preferentemente, hay un periodo de tiempo durante el cual ambos (o todos) los agentes activos ejercen de forma simultánea sus actividades terapéuticas. 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 de forma concurrente o dentro del mismo periodo de tiempo que la otra terapia contra el cáncer (es decir, las terapias tienen lugar de forma concurrente, pero el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno no se administra precisamente en el mismo momento que la otra terapia contra el cáncer). Como alternativa, el anticuerpo anti CD40 de la presente invención o su fragmento de unión al antígeno puede también administrarse antes de, o posteriormente a la otra terapia contra el cáncer. La administración secuencial de las diferentes terapias contra el cáncer

puede realizarse independientemente de que el sujeto tratado responda al primer curso de terapia para disminuir la posibilidad de remisión o recaída.

En algunas formas de realización de la divulgación, los anticuerpos anti CD40 antagonistas descritos en el presente documento, o sus fragmentos de unión al antígeno, se administran en combinación con quimioterapia, y opcionalmente en combinación con trasplante autólogo de médula ósea, en las que el anticuerpo y el(los) agente(s) quimioterapéuticos pueden administrarse de manera secuencial, en cualquier orden, o simultáneamente (es decir, de manera concurrente o dentro del mismo período de tiempo). Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, vincristina, BCNU, melfalán, ciclofosfamida, adriamicina y prednisona o dexametasona.

Por tanto, por ejemplo, en una forma de realización, el anticuerpo anti CD40 se administra en combinación con melfalán, un agente alquilante, y el esteroide prednisona (denominado MP). Como alternativa, se pueden usar los medicamentos alquilantes ciclofosfamida y clorambucilo en lugar de melfalán, en combinación con esteroides y los anticuerpos anti CD40 de la invención. Cuando los sujetos no han respondido a MP o sus alternativas y para los sujetos que recane tras el tratamiento con MP, los anticuerpos anti CD40 de la invención se pueden administrar en combinación con un régimen de quimioterapia que incluye la administración de vincristina, doxorubicina y dosis elevadas de dexametasona (también denominado "VAD"), que además puede incluir la coadministración de ciclofosfamida. En otras formas de realización, los anticuerpos anti CD40 se pueden usar en combinación con otro agente que tiene propiedades anti-angiogénicas, tales como talidomida o interferón alfa. Estos últimos agentes pueden ser eficaces cuando un sujeto es resistente a terapia con MP y/o VAD. En otras formas de realización más, el anticuerpo anti CD40 puede administrarse en combinación con un inhibidor del proteasoma, tal como bortezomib (Velcade™), cuando este último se administra en sujetos cuya enfermedad ha recaído tras dos tratamientos previos y que han demostrado resistencia a su último tratamiento. Como alternativa, los anticuerpos anti CD40 se pueden administrar a un sujeto en combinación con quimioterapia de dosis elevadas, sola o con trasplante de médula ósea.

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

Formulaciones farmacéuticas y modos de administración

Los anticuerpos anti CD40 antagonistas de esta invención se administran en una concentración que es terapéuticamente eficaz para prevenir o tratar el mieloma múltiple. Típicamente, los anticuerpos se administran por medio de inyección, ya sea por vía intravenosa o por vía intraperitoneal. Los procedimientos para llevar a cabo esta administración son conocidos por los expertos en la técnica. También es posible obtener composiciones que pueden administrarse por vía tópica o por vía oral, o que pueden ser capaces de transmitirse a través de membranas mucosas.

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

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

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

ES 2 346 978 T3

Un experto en la técnica puede determinar fácilmente sin excesiva experimentación la cantidad de al menos un anticuerpo anti CD40 su fragmento de unión a antígeno a administrar. Los factores que influyen en el modo de administración y la respectiva cantidad de de al menos un anticuerpo anti CD40 antagonista (o su fragmento) incluyen, entre otros, la enfermedad concreta 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 del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento administrar dependerá del modo de administración y de si el sujeto se someterá a una monodosis o a dosis múltiples de este agente antitumoral. Por lo general, al aumentar el peso del sujeto sometido al tratamiento, resulta de preferencia una dosis más alta del agente anticuerpo. La dosis de anticuerpo anti CD40 o su fragmento que se va a administra está en el intervalo de aproximadamente 0,003 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, preferentemente en el intervalo de 0,01 mg/kg, a 40 mg/kg. Por tanto, por ejemplo, la dosis puede ser 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.

En otra forma de realización de la divulgación, el procedimiento comprende la administración de dosis múltiples de anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento. El procedimiento puede comprender la administración de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o más dosis terapéuticamente eficaces de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento. La frecuencia y duración de administración de las dosis múltiples de las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpo anti CD40 o su fragmento pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica sin excesiva experimentación. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo puede incluir un tratamiento único o, de preferencia, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo de preferencia, se trata al sujeto con anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 y 20 mg/kg de peso corporal, una vez por semana durante aproximadamente entre 1 y 10 semanas, de preferencia aproximadamente entre 2 y 8 semanas, de más preferencia aproximadamente entre 3 y 7 semanas, y aún de más preferencia durante aproximadamente 4, 5, ó 6 semanas. El tratamiento puede llevarse a cabo anualmente para prevenir la recaída o tras la indicación de la recaída. También se apreciará que la dosis eficaz de anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno usado para el tratamiento puede aumentar o disminuir en el transcurso de un tratamiento particular. Los cambios en la dosis pueden ser el resultado y pueden resultar evidentes a partir de los resultados de los ensayos de diagnóstico como se describe en el presente documento. Por consiguiente, en una forma de realización, el régimen de dosificación incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti CD40 o su fragmento en los días 1, 7, 14 y 21 de un período de tratamiento. En otra forma de realización, el régimen de dosificación incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti CD40 o su fragmento en los días 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 de una semana en un período de tratamiento. Otras formas de realización incluyen un régimen de dosificación que tiene una primera administración de una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti CD40 o su fragmento en los días 1, 3, 5 y 7 de una semana en un período de tratamiento; un régimen de dosificación incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti CD40 o su fragmento en los días 1 y 3 de una semana en un período de tratamiento; y un régimen de dosificación de preferencia que incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti CD40 o su fragmento en el día 1 de una semana en un período de tratamiento. El período de tratamiento puede comprender 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, un mes, 3 meses, 6 meses o un año. Los períodos de tratamiento pueden ser consecutivos o pueden estar separados uno de otro por un día, una semana, 2 semanas, un mes, 3 meses, 6 meses o un año.

En algunas formas de realización, la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno varía desde aproximadamente 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg, desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 40 mg/kg, desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 0,5 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 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.

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

ES 2 346 978 T3

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

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

Las composiciones farmacéuticas útiles en los procedimientos dados a conocer en el presente documento comprenden variantes biológicamente activas de los anticuerpos anti CD40 antagonistas de la invención. Tales variantes deben retener la actividad biológica deseada del polipéptido nativo tal que la composición farmacéutica que comprende el polipéptido variante tenga el mismo efecto terapéutico que la composición farmacéutica que comprende el polipéptido nativo cuando se administra a un sujeto. Es decir, el anticuerpo anti CD40 variante servirá como componente terapéuticamente activo en la composición farmacéutica de manera similar a la observada para el anticuerpo antagonista nativo, por ejemplo 5.9 o CHIR-12.12 como se expresa por la línea celular de hibridoma 5.9 ó 12.12, respectivamente. En la técnica están disponibles procedimientos para determinar si un anticuerpo anti CD40 variante retiene la actividad biológica deseada, y sirve por consiguiente como un componente terapéuticamente activo en la composición farmacéutica. La actividad biológica de las variantes del anticuerpo puede medirse usando ensayos específicamente diseñados para medir la actividad del anticuerpo antagonista nativo, incluidos los ensayos descritos en el presente documento.

Cualquier composición farmacéutica que comprenda un anticuerpo anti CD40 antagonista que tenga las propiedades de unión descritas en el presente documento como el componente terapéuticamente activo puede usarse en los procedimientos dados a conocer en el presente documento. Por consiguiente, las composiciones líquidas, liofilizadas o secadas por pulverización que comprenden uno o más de los anticuerpos anti CD40 antagonistas de la invención pueden prepararse como una disolución o suspensión acuosa o no acuosa para la posterior administración a un sujeto de acuerdo con los procedimientos dados a conocer en el presente documento. Cada una de estas composiciones comprenderá al menos uno de los anticuerpos anti CD40 antagonistas de la presente invención como un componente terapéuticamente o profilácticamente activo. Por “componente terapéuticamente o profilácticamente activo” se en-

tiende que el anticuerpo anti CD40 está específicamente incorporado en la composición para provocar una respuesta terapéutica o profiláctica con respecto al tratamiento, la prevención o el diagnóstico de una enfermedad o afección en un sujeto cuando se administra la composición farmacéutica a ese sujeto. De preferencia, las composiciones farmacéu-
 5 asociadas con la pérdida de estabilidad y actividad biológica de las proteínas durante la preparación y el almacenamiento.

Pueden añadirse compuestos de formulación a las composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti CD40 antagonista de la invención. Estos compuestos de formulación pueden incluir, pero se limitan a, aceites, polímeros, vitaminas, hidratos de carbono, aminoácidos, sales, tampones, albúmina, tensioactivos o agentes de carga. 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 C₄ a C₈ 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-CH₂-CH₂)_n O-R, en la que R puede ser hidrógeno, o un grupo protector tal como un grupo alquilo o alcanol. De preferencia, el grupo protector tiene entre 1 y 8 carbonos, de más preferencia es metilo. El símbolo n es un número entero positivo, de preferencia entre 1 y 1.000, de más preferencia entre 2 y 500. El PEG tiene 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 dispersión de luz UV) de precipitación, agregación, y/o desnaturalización en esa composición farmacéutica. Con respecto a la estabilidad química, una proteína tal como un anticuerpo, cuando se formula en una composición farmacéutica, 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 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

ES 2 346 978 T3

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 contraion 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.

5 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
10 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
20 aproximadamente 150 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.
25 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
35 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.

45 Los tensioactivos típicos utilizados son tensioactivos noiónicos, incluidos los ésteres de polioxietilensorbitol tales como polisorbato 80 (Tween 80) y polisorbato 20 (Tween 20); ésteres de polioxipropileno-polioxietileno tales como Pluronic F68; alcoholes de polioxietileno tales como Brij 35; simeticona; polietilenglicol tal como PEG400; lisofosfatidilcolina; y polioxietileno-p-t-octilfenol tal como Triton X-100. La estabilización clásica de compuestos farmacéuticos por medio de tensioactivos o 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%.

60 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 aproxima-

damente 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 el tratamiento de un sujeto por un cáncer, en el que el medicamento está coordinado con el tratamiento con al menos otra terapia contra el cáncer.

Por "coordinado" se entiende que el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno se usará antes, durante, o después del tratamiento del sujeto con al menos otra terapia contra el cáncer.

Ejemplos de otras terapias contra el cáncer incluyen, pero no se limitan a, cirugía; terapia con radiación; quimioterapia; opcionalmente en combinación con trasplante autólogo de médula ósea, en las que los agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, fludarabina o fosfato de fludarabina, 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 CD38 dirigido al antígeno CD38 en células B malignas; anticuerpos dirigidos a los receptores del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (anticuerpos anti MHC)

expresados en células B malignas; otros anticuerpos anti CD40 (por ejemplo, SGN-40) dirigidos al antígeno CD40 en células B malignas; y anticuerpos dirigidos al receptor 1 del ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL-R1) (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal agonista humano HGS-ETR1) expresado en una cantidad de tumores sólidos y tumores de origen hematopoyético); terapia del cáncer basada en moléculas pequeñas, incluidos, pero no limitados a, inhibidores de microtúbulos y/o topoisomerasa (por ejemplo, el inhibidor mitótico dolastatina y análogos de dolastatina; el agente de unión a tubulina T900607; XL119; y el inhibidor de la topoisomerasa aminocamptotecina), SDX-105 (clorhidrato de bendamustina), ixabepilona (un análogo de epotilona, también llamado BMS-247550), inhibidores de proteincinasa C, por ejemplo, midostaurina ((PKC-412, CGP 41251, N-benzoilstaurosporina), pixantrona, eloxatina (un agente antineoplásico), ganite (nitrato de galio), Thalomid® (talidomida), derivados inmunomoduladores de la talidomida (por ejemplo, revlimid (anteriormente revimid)), Affinitak™ (inhibidor antisentido de proteincinasa C-alfa), SDX-101 (R-etodolac, que induce la apoptosis de linfocitos malignos), análogos de nucleósidos purina de segunda generación tales como clofarabina, inhibidores de la producción de la proteína Bcl-2 por células cancerosas (por ejemplo, los agentes antisentido oblimersen y Genasense®), inhibidores de proteasoma (por ejemplo, Velcade™ (bortezomib)), inhibidores de cinasas de molécula pequeña (por ejemplo, CHIR-258), inhibidores de VEGF de molécula pequeña (por ejemplo, ZD-6474), inhibidores de la proteína del choque térmico (HSP) 90 de molécula pequeña (por ejemplo, 17-AAG), agentes inhibidores de desacetilasas de histonas de molécula pequeña (por ejemplo, HPC híbrido/polar de citodiferenciación) tales como ácido suberanolhidroxámico (SAHA), y FR-901228 y agentes apoptóticos tales como Trisenox® (trióxido de arsénico) y Xcytrin® (motexafina gadolinio); terapias contra el cáncer basadas en vacunas/inmunoterapia, incluidas, pero no limitadas a, enfoques de vacunas (por ejemplo, Id-KLH, oncofago, vialletina), inmunoterapia personalizada o inmunoterapia activa de idiotipo (por ejemplo, MyVax® Personalized Immunotherapy, denominada formalmente GTOP-99), Promune® (CpG 7909, un agonista sintético para el receptor de tipo toll 9 (TLR9)), terapia con interferón alfa, terapia con interleucina 2 (IL-2), terapia con IL-12, terapia con IL-15 y terapia con IL-21; terapia con esteroides; u otra terapia contra el cáncer; en las que el tratamiento con la terapia adicional contra el cáncer, o terapias adicionales contra el cáncer, se realizan antes, durante, o posteriormente al tratamiento del sujeto con el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno, como se señaló anteriormente en el presente documento.

Por consiguiente, por ejemplo, en algunas formas de realización, la descripción proporciona el uso del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o sus fragmentos de unión al antígeno, en la fabricación de un medicamento para tratar el mieloma múltiple en un sujeto, en el que el medicamento está coordinado con el tratamiento con quimioterapia, en el que el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo constituido por vincristina, doxorubicina, BCNU, melfalán, ciclofosfamida, adriamicina y prednisona o dexametasona. En tal forma de realización, la quimioterapia es melfalán más prednisona; en otras formas de realización, la quimioterapia es VAD (vincristina, doxorubicina y dexametasona).

En otras formas de realización, la descripción proporciona el uso del anticuerpo monoclonal CHIR-12,12 o CHIR-5,9, o sus fragmentos de unión al antígeno, en la fabricación de un medicamento para tratar el mieloma múltiple en un sujeto, en el que el medicamento está coordinado con el tratamiento con al menos otro anticuerpo anticanceroso seleccionado del grupo constituido por el anticuerpo HuMax-CD20 totalmente humano, α -M-CSF anticuerpo 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 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 de origen hematopoyético); y cualquier combinación de los mismos; en las que el medicamento se va a usar antes, durante o después del tratamiento del sujeto con otra terapia anticancerosa o, en el caso de terapias de combinación múltiple, antes, durante o después del tratamiento del sujeto con las demás terapias anticancerosas.

En otras formas de realización más, la presente invención proporciona el uso del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, en la fabricación de un medicamento para tratar el mieloma múltiple en un sujeto, en el que el medicamento está coordinado con al menos otra terapia contra el cáncer basada en moléculas pequeñas seleccionada del grupo constituido por Thalomid® (talidomida), derivados inmunomoduladores de la talidomida (por ejemplo, revlimid (anteriormente revimid)), 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 de molécula pequeña (HSP) 90 (por ejemplo, 17-AAG), agentes inhibidores de desacetilasas de histonas de molécula pequeña (por ejemplo, HPC híbrido/polar de citodiferenciación) tales como ácido suberanolhidroxámico (SAHA), y FR-901228 y agentes apoptóticos tales como Trisenox® (trióxido de arsénico) y cualquier combinación de los mismos; en las que el medicamento se va a usar antes, durante o después del tratamiento del sujeto con otra terapia anticancerosa o, en el caso de terapias de combinación múltiple, antes, durante o después del tratamiento del sujeto con las demás terapias anticancerosas.

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 dan a conocer en el presente documento, o su fragmento de unión al antígeno en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto con mieloma múltiple, en el que el medicamento se usa en un sujeto que ha recibido tratamiento previo con al menos otra terapia contra el cáncer. Por “pretratado”

o “tratamiento previo” se entiende que el sujeto ha recibido otra u otras terapias contra el cáncer (es decir, ha sido tratado con al menos otra terapia contra el cáncer) antes de recibir el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno. “Pretratado” o “tratamiento previo” incluye sujetos que han sido tratados con al menos otra terapia contra el cáncer en el plazo de 2 años, en el plazo de 18 meses, en el plazo de 1 año, en el plazo de 6 meses, en el plazo de 2 meses, en el plazo de 6 semanas, en el plazo de 1 mes, en el plazo de 4 semanas, en el plazo de 3 semanas, en el plazo de 2 semanas, en el plazo de 1 semana, en el plazo de 6 días, en el plazo de 5 días, en el plazo de 4 días, en el plazo de 3 días, en el plazo de 2 días, o incluso en el plazo de 1 día antes del inicio del tratamiento con el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 que se dan a conocer en el presente documento, o su fragmento de unión al antígeno. No es necesario que el sujeto haya sido un paciente que responde al tratamiento previo con la anterior terapia contra el cáncer, o anteriores terapias contra el cáncer. Por consiguiente, el sujeto que recibe el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno podría haber respondido, o podría no haber respondido (es decir el cáncer era refractario), al tratamiento previo con la anterior terapia contra el cáncer, o a una o más terapias anteriores contra el cáncer donde el tratamiento previo comprendía múltiples terapias contra el cáncer. Los ejemplos de otras terapias contra el cáncer para las que un sujeto puede haber recibido tratamiento previo antes de recibir el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno incluyen, pero no se limitan a, cirugía; terapia con radiación; quimioterapia; opcionalmente en combinación con trasplante autólogo de médula ósea, en las que los agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, los presentados en el presente documento anteriormente; otras terapias contra el cáncer con anticuerpos monoclonales incluidas, pero no limitadas a, los anticuerpos anticancerosos presentados en el presente documento anteriormente; terapias contra el cáncer basadas en moléculas pequeñas incluidas, pero no limitadas a, las moléculas pequeñas presentadas en el presente documento anteriormente; terapias contra el cáncer basadas en vacunas/inmunoterapia incluidas, pero no limitadas a, las presentadas en el presente documento anteriormente; terapia con esteroides; otras terapias contra el cáncer; o cualquiera de sus combinaciones.

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

Los siguientes ejemplos se ofrecen a manera 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.

ES 2 346 978 T3

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).

5

TABLA 1

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

10

Hibridoma madre	Clones de hibridoma	unión a la superficie celular	Antagonista	ADCC	CDC	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

15

20

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.

25

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 -5.9). En la Figura 3B se muestra una variante de la cadena pesada para mAb 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.

30

35

40

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.

45

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.

50

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.

55

Se llevan a cabo estudios para determinar si los mAb anti CD40 antagonistas 5.9 y CHIR-12.12 exhiben las propiedades siguientes: (1) se unen a las células del paciente de mieloma múltiple (determinadas usando citometría de flujo); (2) estimulan la muerte celular en las células del paciente de mieloma múltiple mediante el bloqueo de las señales de supervivencia inducidas por ligando del CD40; (3) tienen actividad estimuladora/inhibidora por sí mismos para las células del mieloma múltiple (MM); y/o (4) median en la ADCC como modo de acción.

60

Ejemplo 1

Unión de mAb 5.9 y CHIR-12.12 a células de mieloma múltiple (MM) CD40+ de pacientes de MM

65

Los mAb 5.9 y CHIR-12.12 anti CD40 marcados con FITC se analizan junto con IgG1 humana control marcada con FITC para teñir células de mieloma múltiple (MM). Las células MM CD40+ obtenidas de 8 pacientes se incuban con los mAb 5.9 y CHIR-12.12 anti CD40 marcados con FITC o con la IgG1 humana marcada con FITC. Los análisis de citometría de flujo se realizaron con un FACSCAN V (Becton Dickinson, San Jose, California).

ES 2 346 978 T3

Ejemplo 2

Los mAb 5.9 y CHIR-12.12 anti CD40 bloquean las señales de supervivencia mediadas por el ligando del CD40 en células de mieloma múltiple (MM)

5

Las células de mieloma múltiple obtenidas de 8 pacientes se cultivan por separado con los mAb 5.9 y CHIR-12.12 anti CD40 antagonistas y la IgG1 humana control en las condiciones siguientes:

Concentración de anticuerpos ($\mu\text{g/ml}$)	Células de MM	Células de MM más células CHO fijas que expresan de CD40-ligando
0	+	-
0	+	+
1,0 (anti CD40)	+	+
10,0 (anti CD40)	+	+
100,0 (anti CD40)	+	+
1,0 (Control IgG)	+	+
10,0 (Control IgG)	+	+
100,0 (Control IgG)	+	+

Tras 72 horas, los cultivos se analizan del siguiente modo:

30

Recuentos de células viables y medición de la muerte celular mediante tinción con PI y Anexina V

Pulso durante la noche con timidina tritiada para medir la proliferación

35 Ejemplo 3

Evaluación de la actividad estimuladora/inhibidora de los mAb anti CD40 para las células de mieloma múltiple (MM)

Las células de mieloma múltiple obtenidas de 8 pacientes se cultivan en las siguientes condiciones en presencia de mAb 5.9 y CHIR-12.12, usando IgG como control:

40

Concentración de anticuerpos ($\mu\text{g/ml}$)	Células de MM	Células de MM más células CHO fijas que expresan de CD40-ligando
0	+	-
0	+	-
1,0 (anti CD40)	+	-
10,0 (anti CD40)	+	-
100,0 (anti CD40)	+	-
1,0 (Control IgG)	+	-
10,0 (Control IgG)	+	-
100,0 (Control IgG)	+	-

Tras 72 horas, los cultivos se analizan del siguiente modo:

65

Recuentos de células viables y medición de la muerte celular mediante tinción con PI y Anexina V

Pulso durante la noche con timidina tritiada para medir la proliferación

ES 2 346 978 T3

Ejemplo 4

Capacidad de los mAb 5.9 y CHIR-12.12 anti CD40 para lisar las células de mieloma múltiple (MM) derivadas del paciente mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo ADCC

5

Las células de mieloma múltiple obtenidas de 8 pacientes se cultivan por separado con los mAb 5.9 y CHIR-12.12 antagonistas e IgG1 humana como control en las condiciones siguientes:

Concentración de anticuerpos ($\mu\text{g/ml}$)	Células MM cargadas con ^{51}Cr o calceína AM con células NK de donante sano
0	+
0,1 (anti CD40)	+
1,0 (anti CD40)	+
10,0 (anti CD40)	+
0,1 (Control IgG)	+
1,0 (Control IgG)	+
10,0 (Control IgG)	+
0,1 (rituximab)	+
10,0 (rituximab)	+

45

A las 4 horas se calcula la lisis celular específica mediante la medición de los niveles de ^{51}Cr o pigmento fluorescente liberado.

50

Ejemplo 5

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

55

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

65

ES 2 346 978 T3

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 6

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 $\mu\text{g/ml}$, sobre la superficie modificada del biosensor durante 1,5 minutos a 10 $\mu\text{l/min}$. 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.

Como se muestra en la Tabla 2 a continuación, hay una diferencia de 121 veces en la tasa de disociación de CHIR-5.9 y CHIR-12.12, que da como resultado una afinidad 24 veces mayor para CHIR-12.12.

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

Ejemplo 7

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 $\mu\text{g/ml}$. 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 epítipos 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 interactúa con un epítipo conformacional, parte del cual es una secuencia lineal. El anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 reconoce principalmente la forma no reducida de CD40, lo que sugiere que este anticuerpo interactúa con un epítipo principalmente conformacional (Tabla 3; transferencias no mostradas).

TABLA 3

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.

ES 2 346 978 T3

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

TABLA 4

Análisis del Dominio 2

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

Para definir con más precisión el epítipo reconocido por el mAb CHIR-12.12, se sintetizaron péptidos del Dominio 2 extracelular de CD40, que corresponde a la secuencia PCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQKGTSETDTICT (residuos 61-104 de la secuencia mostrada en SEC ID N° 10 o SEC ID N° 12). Se generaron membranas 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 5.

TABLA 5

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

Número de transferencia	<u>Región de la secuencia</u>
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.

ES 2 346 978 T3

TABLA 6

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

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

Dentro del epítomo 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 epítomo conformacional del mAb CHIR-12.12 contenga este enlace disulfuro (C83-C103) y/o aminoácidos vecinos conformacionalmente próximos a C103

Ejemplo 8

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 $1 \mu\text{g/ml}$ (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, RU). A continuación se añadió CHIR-12.12 ($10 \mu\text{g/ml}$) e IgG de control. Las células se recogieron a los 0 y 20 minutos, a las 2 horas, 6 horas, 18 horas y 26 horas. Se detectaron controles de caspasa 9 escindida, caspasa 3 escindida, PARP escindida y β actina en los lisados celulares por transferencia 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 $1 \mu\text{g/ml}$ (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, RU). A continuación se

ES 2 346 978 T3

añadió CHIR-12.12 (10 $\mu\text{g/ml}$) e IgG de control. Las células se recogieron a los 0 y 20 minutos, a las 2 horas, 6 horas, 18 horas y 26 horas. Se detectaron controles de Mcl-1, XIAP, CD40 y β actina en los lisados celulares por transferencia 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.

10 *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).

20 *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).

30 *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).

45 *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.

60 *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

ES 2 346 978 T3

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

5 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.

15 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

20 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).

25 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).

30 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 9

Actividad antitumoral de CHIR-12.12 en modelos animales de mieloma múltiple

45 Cuando se administra por vía intraperitoneal (IP) una vez a la semana para un total de 3 dosis, el CHIR-12.12 inhibió significativamente el crecimiento del mieloma múltiple estatificado invasivo y no estatificado de un modo dependiente de la dosis. La eficacia podría mejorarse más mediante la combinación de la terapia con anticuerpos con el tratamiento con bortezomib (VELCADE®).

Modelos de xenoinjerto de mieloma múltiple con IM-9

55 Ratones SCID fueron inoculados por vía subcutánea con células tumorales IM-9 (una línea celular de mieloma múltiple humano que expresa CD40 y CD20) en 50% de MATRIGELTM a 5×10^6 células por ratón. En modelos no estatificados, el tratamiento se inició un día después de la implantación del tumor. En modelos estatificados, el tratamiento se inició cuando el volumen del tumor alcanzó $150\text{-}200 \text{ mm}^3$. A los ratones portadores del tumor se les inyectó mAb anti CD40 por vía intraperitoneal una vez a la semana a las dosis indicadas. Los datos se analizaron usando la prueba del orden logarítmico.

60 En un modelo de supervivencia condicionada no estatificado, el CHIR-12.12 prolongó de forma significativa la supervivencia de los ratones portadores del tumor de un modo dependiente de la dosis, con un 60% de supervivencia en el grupo tratado con 0,1 mg/kg de CHIR-12.12 y un 80% de supervivencia en los grupos tratados con 1 y 10 mg/kg de CHIR-12.12, respectivamente, el día 56 ($p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente) (datos no mostrados). Todos los animales en los grupos control con IgG₁ y de bortezomib se sacrificaron el día 18 y el día 26 debido a enfermedad relacionada con el desarrollo del tumor.

ES 2 346 978 T3

En un modelo subcutáneo estatificado, se administró CHIR-12.12 semanalmente a 0,1, 1 y 10 mg/kg e inhibió significativamente el crecimiento del tumor, con una reducción del volumen tumoral del 17 ($p > 0,05$; datos no mostrados), 34% ($p < 0,01$; Figura A) y 44% ($p < 0,001$; datos no mostrados) respectivamente. Bortezomib, cuando se analizó a 0,5 mg/kg dos veces a la semana no inhibió el crecimiento tumoral (datos no mostrados). A la dosis máxima tolerada (DMT) de 1 mg/kg dos veces a la semana, bortezomib inhibió el crecimiento tumoral en un 30% ($p < 0,01$) como se muestra en la Figura A.. No obstante, cuando se administró CHIR-12.12 semanalmente (1 mg/kg) en combinación con la dosis máxima tolerada de bortezomib se observó una reducción del volumen tumoral de más del 50% ($p < 0,001$).

En resumen, el mAb anti CD40 CHIR-12.12 inhibió significativamente el crecimiento tumoral en modelos experimentales de mieloma múltiple. Además, la combinación de CHIR-12.12 con bortezomib tiene potente actividad antitumoral y podría ser clínicamente eficaz para el tratamiento del mieloma múltiple, bien solos o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos.

Ejemplo 10

Estudios clínicos con 5.9 y CHIR-12.12

Objetivos clínicos

El objetivo general es proporcionar una terapia eficaz para el mieloma múltiple dirigiendo una IgG1 anti CD40 a estas células cancerosa. La señal para esta enfermedad se determina en la fase II, aunque puede obtenerse alguna medición de actividad en la fase I. Inicialmente, el agente se estudia en forma de agente único, pero se combinará con otros agentes, quimioterapéuticos y radioterapia a medida que progresa el desarrollo.

Fase I

- Evaluar la seguridad y la farmacocinética - aumento de la dosis en sujetos con mieloma múltiple.
- Elegir la dosis en base a la seguridad, tolerabilidad y cambio en los marcadores de CD40. En general se busca una DMT pero pueden resultar adecuadas otras indicaciones de eficacia (depleción de células de mieloma múltiple CD40+, etc.) para buscar la dosis.
- Considerar más de una dosis, puede ser necesaria alguna búsqueda de dosis en la 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 mieloma múltiple.
- La decisión de interrumpir o continuar los estudios se basa en la seguridad, las dosis y las pruebas preliminares de actividad antitumoral.
- La actividad del fármaco determinada por la tasa de respuesta, se determina en la Fase II.
- Identificar dosis para la Fase II.

Fase II

Se iniciarán varios ensayos en sujetos con mieloma múltiple. En el contexto de la fase II aleatorizada pueden analizarse más de una dosis y más de un regimen.

Dirigir a una población con mieloma múltiple que ha fracasado con el tratamiento convencional actual (fallos de quimioterapia):

- ✓ 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

ES 2 346 978 T3

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 11

Formulación farmacéutica líquida para anticuerpos anti CD40 antagonistas

El objetivo de este estudio fue investigar los efectos del pH de la disolución en la estabilidad del anticuerpo anti 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 pH 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 7.

TABLA 7

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	5,0	9,3

ES 2 346 978 T3

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

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

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

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

SDS-PAGE

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

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC-HPLC)

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

Cromatografía de intercambio catiónico (CEX-H PLC)

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

Resultados y discusión

Estudio de estabilidad conformacional

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

ES 2 346 978 T3

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

5 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,

15 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

20 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 8. 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 8

35 *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

60 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 9 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

ES 2 346 978 T3

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.

5

TABLA 9

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

10

Muestra	Pico principal %					Variantes ácidas %				
	t=0	5 °C 3 m	25 °C 3 m	40 °C 1 m	40 °C 2 m	t=0	5 °C 3 m	25 °C 3 m	40 °C 1 m	40 °C 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	-	-	-

15

20

25

30

Conclusión

35

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

40

45

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.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal anti-CD40 humano que es capaz de unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expresado sobre la superficie de una célula que expresa CD40 humano, en el que dicho anticuerpo monoclonal está exento de actividad agonista significativa, por lo que, cuando dicho anticuerpo monoclonal se une al antígeno CD40 expresado sobre la superficie de dicha célula se inhibe el crecimiento o diferenciación de dicha célula, para usar en un procedimiento para tratar a un sujeto humano por mieloma múltiple, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo monoclonal anti CD40 humano, en el que dicho anticuerpo monoclonal anti CD40 humano se selecciona del grupo constituido por:

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

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

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

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

2. Un anticuerpo monoclonal anti-CD40 humano que es capaz de unirse específicamente al antígeno CD40 cuando se une al antígeno CD40, para usar en un procedimiento para inhibir el crecimiento de las células de mieloma múltiple que expresan antígeno CD40, en el que dicho procedimiento comprende poner en contacto dichas células con una cantidad eficaz del anticuerpo monoclonal anti CD40 humano, en el que dicho anticuerpo monoclonal anti CD40 humano se selecciona del grupo constituido por:

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

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

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

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

3. Uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal que es capaz de unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expresado sobre la superficie de una célula que expresa CD40 humano a en la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto humano por mieloma múltiple, en el que dicho, anticuerpo monoclonal está exento de actividad agonista significativa, de modo que, cuando dicho anticuerpo monoclonal se une al antígeno CD40 expresado sobre la superficie de dicha célula se inhibe el crecimiento o diferenciación de dicha célula, en el que dicho anticuerpo monoclonal anti CD40 humano se selecciona del grupo constituido por:

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

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

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

ES 2 346 978 T3

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

5

4. Uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 humano que es capaz de unirse específicamente a un antígeno CD40 en la fabricación de un medicamento para inhibir el crecimiento de células de mieloma múltiple que expresan el antígeno CD40, en el que dicho anticuerpo monoclonal está exento de actividad agonista significativa cuando está unido al antígeno CD40, en el que dicho anticuerpo monoclonal anti CD40 humano se selecciona del, grupo constituido por:

10

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

15

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

20

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

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

25

5. Un procedimiento *in vitro* para inhibir el crecimiento de células de mieloma múltiple que expresan antígeno CD40, en el que dicho procedimiento comprende poner en contacto dichas células con una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti CD40 humano que es capaz de unirse específicamente a dicho antígeno CD40, en el que dicho anticuerpo monoclonal está exento de actividad agonista significativa cuando está unido al antígeno CD40, en el que dicho anticuerpo se selecciona del, grupo constituido por:

30

35

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

40

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

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

45

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

50

6. El anticuerpo monoclonal, uso o procedimiento de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho anticuerpo se selecciona del grupo constituido por el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5542 y el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N° PTA-5543.

55

7. El anticuerpo monoclonal, uso o procedimiento de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo constituido por:

60

(i) un anticuerpo monoclonal 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;

65

(ii) un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene los residuos 50-54, 69-84 y 114-121 de SEC ID N° 4 o la SEC ID N° 7;

ES 2 346 978 T3

- (iii) un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena ligera que contiene los residuos 46-52, 70-72 y 111-116 de SEC ID N° 2 y SEC ID N° 6; y
- (iv) un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene los residuos 45-51, 72-74 y 115-120 de SEC ID N° 4; o SEC ID N° 7.

8. El anticuerpo monoclonal, uso o procedimiento de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por:

- (i) los residuos 21-132 de SEC ID N° 2;
- (ii) los residuos 21-239 de SEC ID N° 2;
- (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;
- (vi) SEC ID N° 4;
- (vii) los residuos 20-469 de SEC ID N° 5;
- (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;
- (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
- (xiii) SEC ID N° 2 y SEC ID N° 5.

9. El anticuerpo monoclonal, uso o procedimiento de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por:

- (i) los residuos 21-132 de SEC ID N° 6;
- (ii) los residuos 21-239 de SEC ID N° 6;
- (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;
- (vi) SEC ID N° 7;
- (vii) los residuos 20-474 de SEC ID N° 8;
- (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;
- (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
- (xiii) SEC ID N° 6 y SEC ID N° 8.

ES 2 346 978 T3

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

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

10 12. El anticuerpo monoclonal, uso o procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho anticuerpo monoclonal es un fragmento de unión a antígeno de dicho anticuerpo monoclonal anti CD40, en el que el fragmento conserva la capacidad para unirse de forma específica a dicho antígeno CD40 humano.

13. El anticuerpo monoclonal, uso o procedimiento de la reivindicación 12, en el que dicho fragmento se selecciona del grupo constituido por un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento Fv y un fragmento Fv de cadena sencilla.

15 14. El anticuerpo monoclonal, uso o procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho anticuerpo monoclonal se produce en una línea celular CHO.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1A

Cadena ligera de CHIR 12,12:

líder:

MALPAQLLGLLMLWVSGSSG

variable:

DIVMTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQSILLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQVLISLGSNRASG
VPDRFSGSGSDFTLTKISRVEAEDVGVYVYCMQARQTPFTFGPGTKVDIR

constante:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIGURA 1B

Cadena pesada de CHIR 12,12:

líder:

MEFGLSWVFLVAILRGVQC

variable:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYEESNRYHAD
SVKGRFTISRDNKSKITLYLQMNSLRTEDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGLTQTLTVSS

constante:

ASTKGPSVFPLAPASKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YLSLVVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

región constante alternativa:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YLSLVVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURA 2A

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

5'atggcgctccctgctcagctcctggggctgctaagtctctgggtctctggatccagtggggatattgtgatgactcagctccactctc
cctgaccgtcaccctggagagccggcctccatctcctgcaggtccagtcagagcctcctgtatagtaatggatacaactattggattg
gtacctgcagaagccaggcagctccacaggtcctgatctctgggttaatacggcctccggggctccctgacaggtcagtgga
gtggatcaggcacagattttacactgaaaatcagcagagtgagggtgaggatgtggggtttactgcatgcaagctcgaacaact
ccattcactttcggcctgggaccaaaagtggatatcagacgaactgtggctgcaccatctgtctcattctcccgccatctgatgagcag
tgaaatctggaactgcctctgtgtgctcgtgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaagggtgataacgccctcc
aatcgggtaactccaggagaggtgtcacagagcagcagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaa
agcagactacgagaacacaaaagtctacgcctgcgaagtcaccatcaggcctgagctcgcctcacaagaagagcttcaacaggg
gagagtgtag3'

FIGURA 2B

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

5'atggagttgggctgagctgggtttcctgttgcattttaagaggtgtccagtgctcaggtgcagttgggtggagctggggaggcgt
ggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcacctcagtagctatggcatgcaactgggctccgagcgtc
caggcaaggggctggagtggtggcagttatatacatatagggaaagtaatagataccatgcagactccgtgaagggccgattacca
tctccagagacaattccaagatcacgctgtatctgcaaatgaacagcctcagaactgaggacacggctgtgtactgtgcgagagat
gggggtatagcagcacctggcctgactactggggccagggaacctggtcaccgtctcctcagcaagtaccaagggccatccgt
cttccccctggcggcctagcaagagcactctggggccacagcggcctgggctgcctggcaagactactcccgaaccgg
tgacggtgtcgtggaactcaggcggcctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgtcctacagctcagactactcctcag
cagcgtggtgacctgccctccagcagctgggcacccagacctacatctgcaactgaaacacaagcccagcaacaccaaggtgg
acaagagagttggtgagaggccagcacaggaggaggaggtgtctgctggaagccaggctcagcgtcctgcctggagcatccc
gctatgcagctccaggtccaggcagcaaggcaggccccgtctgcctctcaccggaggcctctgccgccccactcatgctcagg
gagagggctctctggcttttcccaggctctgggcaggcacaggtagggtgccctaaccagggcctgcacacaaaggggcaggt
gctgggctcagacctgcaaagaccatctccggaggaccctgccctgacctaaagcccaccaaaggccaactctccactccc
tcagctcggacacctctctcctccagattccagtaactccaatctctctcagagcccaaatctgtgacaaaactcacatgc
ccaccgtgcccaggtaagccagcccaggcctcgcctccagctcaaggcgggacaggtgccctagagtagcctgatccaggggac
aggccccagccgggtgctgacacgtccacctccatctctcctcagcactgaactcctggggggaccgtcagcttctcttcccc
aaaaccacaggacacctcatgatctccggaccctgaggtcacatgctggtggtggaggtgagccacgaagaccctgaggtca
agttcaactggtacgtggagggcgtggaggtgcataatgcaagacaagccgcgggaggagcagtaacaagcagctaccgtgt
ggtcagcgtcctcaccgtctcaccaggactggctgaatggcaaggagtaacaagtgaaggtctccaacaaaggcctcccagccc
ccatcgagaaaacctctccaaaaggcgaaggtgggaccctgggggtgcaggggccacatggacagaggccggctcggccaccc
tctgacctgagagtgaccgtgtaccaacctctgtcctacagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgg
gaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtaaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaa
tgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctccttctctctatagcaagctcaccgtggac
aagagcaggtggcagcaggggaacgtctctcatgctcctgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgagaagagcctctcc
ctgtctccgggtaaatga3'

FIGURA 3A

Cadena ligera de CHIR-5,9:

líder:

MALLAQLLGLLMLWVPGSSG

variable:

AIVMTQPPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWLQORPGQPPRLLIYKFFRRLSG
VPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQVTQFPHTFGQGTRLEIK

constante:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIGURA 3B

Cadena pesada de CHIR-5,9:

líder:

MGSTAILALLLAVLQGVCA

variable:

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSP
SFQGGVTTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMY YCARGTAAGR DYYYYY GMDVWGQGT TTVTVS
S

constante:

ASTKGPSVFPLAPASKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YLSVSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

región constante alternativa:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YLSVSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURA 4A

Secuencia codificadora para la isoforma corta 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 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 ggtttctgat
421 accatctgcg agccctgccc agtcggcttc ttcaccaatg tgtcatctgc ttcgaaaaa
481 tgtcaccctt ggacaaggtc cccaggatcg gctgagagcc ctggtggtga tccccatcat
541 cttegggatc ctgttgcca tctcttggg gctggtcttt atcaaaaagg tggccaagaa
601 gccaaccaat aa

FIGURA 4B

Isoforma corta codificada de CD40 humano:

1 mvrplqcvtl wgciltavhp epptacrekq ylinsqccsl cpggqklvsd cteftetecl
61 pcgesefldt wnrethchqh kywdpnlglr vqqkgtsetd tictceegwh ctseacescv
121 lhrscspgfg vkqiatgvsd ticepcpvfg fsnvssafek chpwtrspgs aesp ggdphh
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 tactgaaac ggaatgcctt
181 ccttgcggtg aaagcgaatt cctagacacc tggaacagag agacacactg ccaccagcac
241 aaatactgcg accccaacct agggcttcgg gtccagcaga agggcacctc agaaacagac
301 accatctgca cctgtgaaga aggctggcac tgtacgagtg aggctgtga gagctgtgtc
361 ctgcaccgct catgctcgcc cggctttggg gtcaagcaga ttgtacagg ggtttctgat
421 accatctgcg agccctgccc agtcggcttc ttctccaatg tgtcatctgc tttcgaaaaa
481 tgtcacctt ggacaagctg tgagaccaa gacctggtt tgcaacaggc aggcacaaac
541 aagactgatg ttgtctgtgg tcccaggat cggctgagag ccctggtggt gatccccatc
601 atcttcggga tctgtttgc catcctcttg gtgctgtct ttatcaaaaa ggtggccaag
661 aagccaacca ataaggcccc ccacccaag caggaacccc aggagatcaa tttcccgac
721 gatcttctg gtcceaacac tgctgctcca gtgcaggaga cttacatgg atgccaaccg
781 gtcaccaggc aggatggcaa agagagtcgc atctcagtc aggagagaca gtga

FIGURA 4D

Isoforma larga codificada para CD40 humano:

1 mvrplqcvl wgciltavhp epptacrekq ylinsqccsl cpggqklvsd cteftetecl
61 pcgesefldt wnrethchqh kycondnlgr vqqkgtsetd tictceegwh ctseacescv
121 lhrscspgfg vkqiatgvsd ticepcpvgf fsnvssafek chpwtscetk dlvvqqagtn
181 ktdvvcgpqd rlravvipi ifgilfail vlvfikkvak kptnkaphpk qepqeinfpd
241 dlpgsntaap vqetlhgcqp vtqedgkesr isvqerq

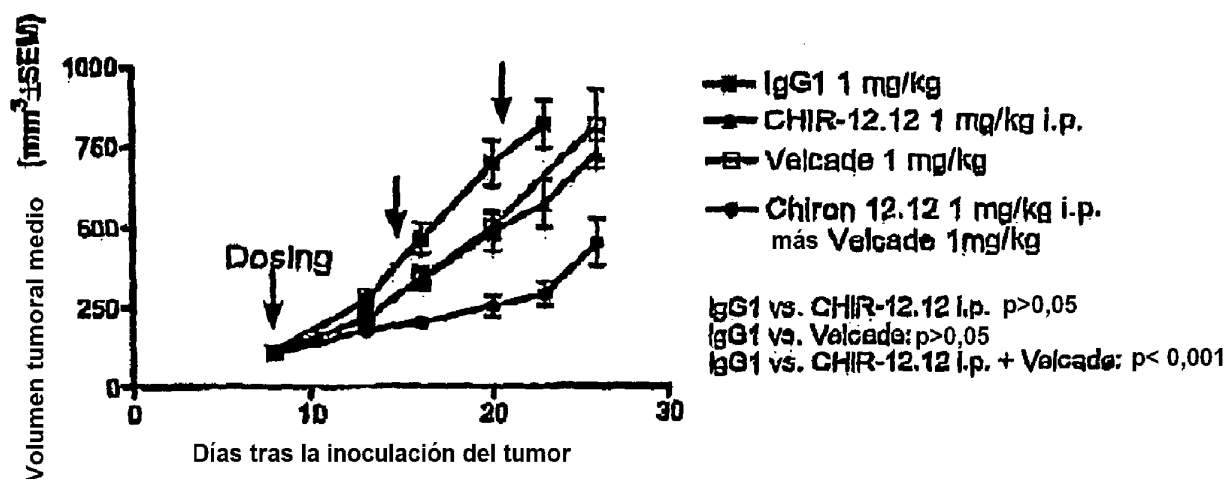
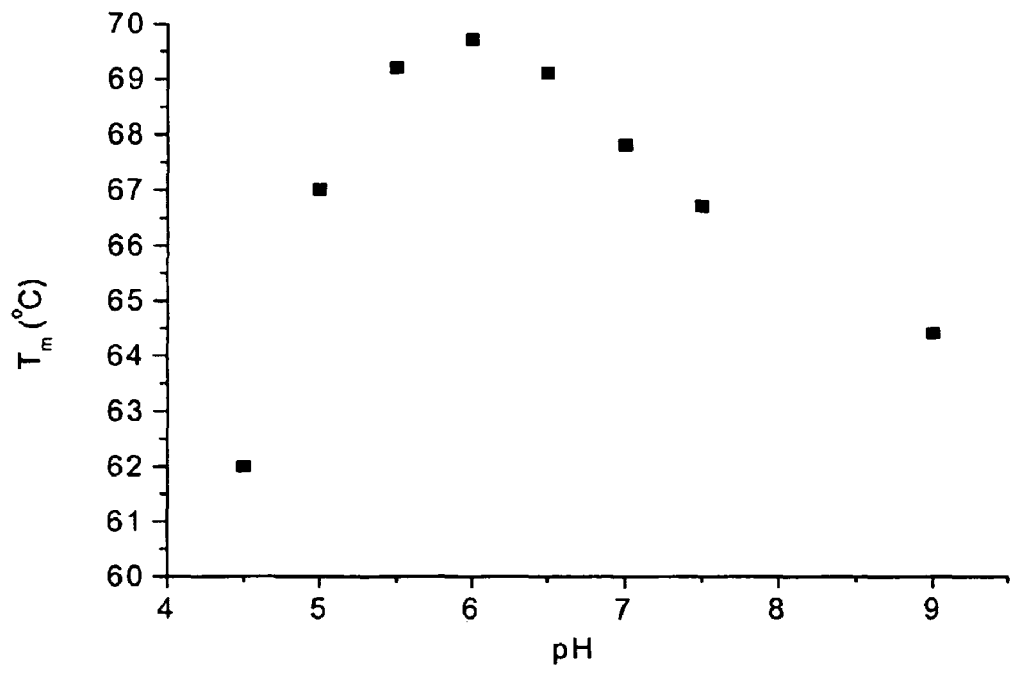


FIGURA 5

FIGURA 6



ES 2 346 978 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Long, Li
Luqman, Mohammad
Yabannavar, Asha
Zaror, Isabel
- <120> Uso de anticuerpos monoclonales anti CD40 antagonistas para el tratamiento del mieloma múltiple
- <130> PP22589.002 (282915)
- 10 <150> 60/565,709
<151> 26/04/2004
<150> 60/565,710
<151> 2004-04-27
- 15 <150> 60/525,579
<151> 2003-11-26
<150> 60/517,337
- 20 <151> 2003-11-04
<160> 12
<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- 25 <210> 1
<211> 720
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> Secuencia codificadora para la cadena ligera del anticuerpo anti CD40 CHIR-12.12 humano
<221> CDS
<222> (1)... (720)

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 346 978 T3

<400> 1

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

ES 2 346 978 T3

<210> 2

<211> 239

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

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

10 <400> 2

```

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

```

35

```

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

```

55

<210> 3

<211> 2016

60 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

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

65

ES 2 346 978 T3

<400> 3

```

5      atggagtttg  ggctgagctg  ggttttcett  gttgctatth  taagaggtgt  ccagtgtcag  60
      gtgcagttgg  tggagtctgg  gggagggcgtg  gtccagcctg  ggaggtccct  gagactctcc  120
      tgtgcagcct  ctggattcac  cttcagtagc  tatggcatgc  actgggtccg  ccaggctcca  180
      ggcaaggggc  tggagtgggt  ggcagttata  tcatatgagg  aaagtaatag  ataccatgca  240
      gactccgtga  agggccgatt  caccatctcc  agagacaatt  ccaagatcac  gctgtatctg  300
10     caaatgaaca  gcctcagaac  tgaggacacg  gctgtgtatt  actgtgagag  agatgggggt  360
      atagcagcac  ctgggcctga  ctactggggc  cagggaaacce  tggtcaccgt  ctctcagca  420
      agtaccaagg  gcccatccgt  cttccccctg  gcgcccgcta  gcaagagcac  ctctgggggc  480
      acagcggccc  tgggctgcct  ggtcaaggac  tacttccccg  aaccggtgac  ggtgtcgtgg  540
      aactcaggcg  cctgaccag  cggcgtgcac  accttccccg  ctgtcctaca  gtctcagga  600
15     ctctactccc  tcagcagcgt  ggtgaccgtg  ccctccagca  gcttggggc  ccagacctac  660
      atctgcaacg  tgaatcacia  gccagcaac  accaaggtgg  acaagagagt  tggtgagagg  720
      ccagcacagg  gaggaggggt  gtctgtctgga  agccaggctc  agcgctcctg  cctggacgca  780
      tcccggctat  gcagtcccag  tccagggcag  caaggcaggc  cccgtctgcc  tcttaccacc  840
      gaggectctg  cccgccccac  tcatgtctag  ggagaggggtc  ttctggcttt  ttccccaggc  900
20     tctgggcagg  cacaggctag  gtgcccctaa  cccaggccct  gcacaciaag  gggcaggtgc  960
      tgggctcaga  cctgccaaga  gccatcccg  ggaggaccct  gccctgacc  taagcccacc  1020
      ccaaaggcca  aactctccac  tccctcagct  cggacacctt  ctctcctccc  agattccagt  1080
      aactcccaat  cttctctctg  cagagcccaa  atcttgtgac  aaaactcaca  catgccacc  1140
25     gtgcccagg  aagccagccc  aggcctcgcc  ctccagctca  aggcgggaca  ggtgccctag  1200
      agtagcctgc  atccagggac  agccccagc  cgggtgctga  cacgtccacc  tccatctctt  1260
      cctcagcacc  tgaactcctg  gggggaccgt  cagtcttct  cttcccccca  aaaccaagg  1320
      acaccctcat  gatctcccgg  acccctgagg  tcacatgcgt  ggtggtggac  gtgagccacg  1380
      aagaccctga  ggtcaagttc  aactggtacg  tggacggcgt  ggaggtgcat  aatgccaaga  1440
30     caaagccgcg  ggaggagcag  tacaacagca  cgtaccgtgt  ggtcagcgtc  ctaccgtcc  1500
      tgcaccagga  ctggctgaat  ggcaaggagt  acaagtgcaa  ggtctccaac  aaagccctcc  1560
      cagccccat  cgagaaaacc  atctccaaag  ccaaagggtg  gaccctggg  gtgcgagggc  1620
      cacatggaca  gaggccggct  cggccccacc  tctgccctga  gagtgaccgc  tgtaccaacc  1680
      tctgtcccta  cagggcagcc  ccgagaacca  caggtgtaca  ccctgcccc  atccccggag  1740
35     gagatgacca  agaaccagg  cagcctgacc  tgctgtgtca  aaggcttcta  tcccagcgac  1800
      atcgccgtgg  agtgggagag  caatgggcag  ccggagaaca  actacaagac  cagcctccc  1860
      gtgctggact  ccgacggctc  cttcttctc  tatagcaagc  tcaccgtgga  caagagcagg  1920
      tggcagcagg  ggaacgtctt  ctcatgctcc  gtgatgcatg  aggctctgca  caaccactac  1980
40     acgcagaaga  gcctctccct  gtctccgggt  aatga  2016

```

<210> 4

<211> 469

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Cadena pesada del anticuerpo anti CD40 CHIR-12.12 humano

55

60

65

ES 2 346 978 T3

<400> 4

5 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 10 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
 15 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr
 115 120 125
 20 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 Ala Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 145 150 155 160
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175
 25 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205
 30 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
 35 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 245 250 255
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270
 40 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
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 305 310 315 320
 45 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 340 345 350
 50 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 370 375 380
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400
 55 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
 60 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460
 Leu Ser Pro Gly Lys
 465

ES 2 346 978 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

15 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 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
 25 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ile
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr
 115 120 125
 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
 35 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205
 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

65

ES 2 346 978 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
 5 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
 10 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
 30 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
 40 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
 45 130 135 140
 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
 50 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
 55 210 215 220
 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 2 346 978 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		
10	Pro	Gly	Glu	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe
		35					40						45			
	Thr	Ser	Tyr	Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
		50					55					60				
15	Glu	Trp	Met	Gly	Ile	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser
	65				70					75						80
	Pro	Ser	Phe	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser
					85					90					95	
	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met
				100					105					110		
20	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Thr	Ala	Ala	Gly	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr
			115					120					125			
	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser
		130					135					140				
25	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ala	Ser	Lys
	145				150						155					160
	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
					165					170					175	
	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
				180					185					190		
30	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
			195					200						205		
	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
		210					215						220			
	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
	225				230						235					240
35	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
					245					250					255	
	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
				260					265					270		
	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
			275					280					285			
40	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
		290					295					300				
	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
	305					310					315					320
45	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		
	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
			355					360					365			
50	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
		370					375						380			
	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
	385				390						395					400
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
					405					410					415	
55	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
				420					425					430		
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
			435					440					445			
60	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
		450					455					460				
	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
	465						470									

<210> 8

65 <211> 474

<212> PRT

ES 2 346 978 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

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

5

<400> 8

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

ES 2 346 978 T3

<210> 9
 <211> 612
 <212> ADN
 5 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)...(612)
 <221> carac misc
 <222> (1)...(612)
 <223> Secuencia codificadora para la isoforma corta del CD40 humano
 15 <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
    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                    25                    30

    ata aac agt cag tgc tgt tct ttg tgc cag cca gga cag aaa ctg gtg 144
    Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val
                    35                    40                    45

    agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc ctt cct tgc ggt gaa 192
    Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu
                    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
                    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
                    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
                    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
                    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
                    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
    145                    150                    155                    160

    tgt cac cct tgg aca agg tcc cca gga tcg gct gag agc cct ggt ggt 528
    Cys His Pro Trp Thr Arg Ser Pro Gly Ser Ala Glu Ser Pro Gly Gly
                    165                    170                    175

    gat ccc cat cat ctt cgg gat cct gtt tgc cat cct ctt ggt gct ggt 576
    Asp Pro His His Leu Arg Asp Pro Val Cys His Pro Leu Gly Ala Gly
                    180                    185                    190

    ctt tat caa aaa ggt ggc caa gaa gcc aac caa taa 612
    Leu Tyr Gln Lys Gly Gly Gln Glu Ala Asn Gln *
                    195                    200
  
```

ES 2 346 978 T3

<210> 10

<211> 203

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

```

10      Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
        1          5          10          15
      Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu
        20          25          30
      Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val
        35          40          45
15      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
20      Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
        100          105          110
      Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
        115          120          125
25      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
30      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

```

35 <210> 11

<211> 834

<212> ADN

40 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

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

45 <221> carac misc

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

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

50 <400> 11

```

      atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctc tgg ggc tgc ttg ctg acc 48
      Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
      1          5          10          15
55      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
60      ata aac agt cag tgc tgt tct ttg tgc cag cca gga cag aaa ctg gtg 144
      Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val
        35          40          45
      agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc ctt cct tgc ggt gaa 192
      Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu
        50          55          60
65      agc gaa ttc cta gac acc tgg aac aga gag aca cac tgc cac cag cac 240

```

ES 2 346 978 T3

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

<210> 12

<211> 277

60 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 346 978 T3

<400> 12

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

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

 45

 50

 55

 60

 65