

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 428 089**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/28

(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2006 E 06836747 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 1957538**

(54) Título: **Usos de anticuerpos anti-cd40**

(30) Prioridad:

01.11.2005 US 732580 P

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

05.11.2013

(73) Titular/es:

**NOVARTIS AG (50.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH y
XOMA TECHNOLOGY LTD. (50.0%)**

(72) Inventor/es:

**AUKERMAN, SHARON LEA y
LUQMAN, MOHAMMAD**

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 428 089 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

Usos de anticuerpos anti-CD40

5 La presente invención se refiere a nuevos usos de anticuerpos anti-CD40, en concreto en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias asociadas con células que expresan CD40.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 Muchos de los miembros de la familia de ligandos del factor de necrosis tumoral (FNT) y sus correspondientes receptores regulan el crecimiento de las células normales induciendo la apoptosis o la potenciación de la supervivencia y la proliferación celular. Es este equilibrio entre las señales de apoptosis y las señales de supervivencia y proliferación el que mantiene la homeostasis celular normal. Hasta la fecha se han identificado al menos 26 receptores de la familia de FNT y 18 ligandos de la familia del FNT. Las formas biológicamente activas de los receptores y los ligandos son trímeros de proteínas autoensambladas. Se han identificado formas transmembrana y solubles de los receptores y de los ligandos. Aunque los dominios intracelulares de los receptores no comparten homología de secuencia, sus dominios extracelulares comprenden repeticiones ricas en cisteína de 40 aminoácidos. Sus colas citoplasmáticas señalizan interactuando con dos grupos principales de proteínas intracelulares: los factores asociados al receptor de FNT (TRAF) y las proteínas que contienen el dominio de muerte (DD). La interacción entre al menos seis TRAF y sitios de unión a TRAF humanos en la cola citoplasmática de algunos de estos receptores inicia varias vías de señalización, incluidas AKT (la serina/treonina quinasa conocida como proteína quinasa B o PKB), factor nuclear κB (NF-κB), y proteínas quininas activadas por mitógenos (MAPK). Véase, por ejemplo, la revisión de Younes y Kadin (2003) *J. Clin. Oncol.* 18:3526-3534.

25 El miembro CD40 de la familia de receptores de FNT es un antígeno de superficie celular de 50-55 kDa presente en la superficie de los linfocitos B humanos normales y neoplásicos, las células dendríticas, los monocitos, los macrófagos, los linfocitos T CD8⁺, las células endoteliales y las células monocíticas y epiteliales. El antígeno CD40 también se expresa en los linfocitos T activados, las plaquetas activadas, las células inflamadas del músculo liso vascular, los eosinófilos, las membranas sinoviales en la artritis reumatoide, los fibroblastos dérmicos y otros tipos de células no linfoides. Dependiendo del tipo de célula que expresa CD40, la ligación puede inducir la diferenciación, activación, proliferación y adhesión intercelular. Por ejemplo, la unión de CD40 con su ligando afín, CD40L (también denominado CD154), estimula la proliferación de linfocitos B y la diferenciación a células plasmáticas, la producción de anticuerpos, el cambio de isotipo y la generación de memoria de linfocitos B. Durante la diferenciación de los linfocitos B, el CD40 se expresa en linfocitos pre-B, pero se pierde tras la diferenciación a células plasmáticas.

30 35 El ligando de CD40 (CD40L), también conocido como CD154, es una proteína transmembrana de 32-33 kDa, que también existe en dos formas solubles biológicamente activas más pequeñas, de 18 kDa y 31 kDa, respectivamente (Graf *et al.* (1995) *Eur. J. Immunol.* 25: 1749-1754; Mazzei *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270:7025-7028; Pietravalle *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* 271:5965-5967). El CD40L se expresa en los linfocitos T auxiliares CD4⁺ activados, pero no en aquellos en reposo (Lane *et al.* (1992) *Eur. J. Immunol.* 22:2573-2578; Spriggs *et al.* (1992) *J. Exp. Med.* 176:1543-1550; y Roy *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151:1-14). Se han clonado y caracterizado tanto CD40 como CD40L (Stamenkovi *et al.* (1989) *EMBO J.* 8:1403-1410; Armitage *et al.*, *Nature* 357:80-82 (1992); Lederman *et al.* (1992) *J. Exp. Med.* 175:1091-1101; y Hollenbaugh *et al.* (1992) *EMBO J.* 11:4313-4321). Véase también la patente de EE.UU. N° 5.945.513, que describe el CD40L humano. Las células transfectadas con el gen de CD40L y que expresan la proteína CD40L en su superficie pueden activar la proliferación de linfocitos B, y junto con otras señales estimuladoras, pueden inducir la producción de anticuerpos (Armitage *et al.* (1992) *supra*; y la patente de EE.UU. N° 5.945.513). Los pacientes con enfermedad autoinmunitaria tienen niveles séricos elevados de CD40L soluble (sCD40L) que no se observan en sujetos sanos. La sobreexpresión de CD40L origina enfermedades autoinmunitarias similares al lupus eritematoso sistémico en modelos de roedores (Higuchi *et al.* (2002) *J. Immunol.* 168:9-12). Por el contrario, la ausencia de CD40L funcional en los linfocitos T activados origina el síndrome de hiper-IgM ligado al cromosoma X (Allen *et al.* (1993) *Science* 259:990; y Korthauer *et al.* (1993) *Nature* 361:539). Además, el bloqueo de la interacción CD40/CD40L puede prevenir el rechazo de trasplante en modelos de primates no humanos. Véase, por ejemplo, Wee *et al.* (1992) *Transplantation* 53:501-7.

40 45 50 55 La expresión de CD40 en las APC desempeña una función coestimuladora importante en la activación de estas células. Por ejemplo, se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales anti-CD40 agonistas (mAbs) imitan los efectos de los linfocitos T auxiliares en la activación de los linfocitos B. Cuando se presentan en células adherentes que expresan FcγRII, estos anticuerpos inducen la proliferación de los linfocitos B (Banchereau *et al.* (1989) *Science* 251:70). Por otra parte, los mAbs anti-CD40 agonistas pueden sustituir la señal de los T auxiliares para la secreción de IgM, IgG e IgE en presencia de IL-4 (Gascan *et al.* (1991) *J. Immunol.* 147:8). Además, los mAbs anti-CD40 agonistas pueden evitar la muerte celular programada (apoptosis) de los linfocitos B aislados de los ganglios linfáticos.

60 65 Estas y otras observaciones apoyan la teoría actual de que la interacción de CD40 y CD40L desempeña un papel fundamental en la regulación de las respuestas inmunitarias celulares y humorales. Estudios más recientes

han revelado un papel mucho más amplio de la interacción CD40/CD40L en diversos procesos fisiológicos y patológicos.

La vía de transducción de señales de CD40 depende de la regulación coordinada de muchos factores intracelulares. Al igual que otros miembros de la familia de receptores de FNT, el CD40 activa los TRAF, incluidos TRAF-2, -3, -5, y -6, que regulan positivamente diversas vías de señalización tras el acoplamiento de CD40 con CD40L (ya sea CD40L unido a membrana o CD40L soluble), incluidas la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK), la quinasa c-Jun aminoterminal (JNK), p38 MAPK y NF- κ B (véase, por ejemplo, Younes y Carbone (1999) *Int. J. Biol. Markers* 14:135-143; van Kooten y Banchereau (2000) *J. Leukoc. Biol.* 67:2-17).

Se ha demostrado que la señalización a través de CD40 evita la muerte celular por apoptosis (Makus *et al.* (2002) *J. Immunol.* 14:973-982). Las señales apoptóticas son necesarios para inducir la muerte celular programada de manera coordinada. Las señales de muerte celular pueden incluir estímulos intrínsecos desde dentro de la célula, tales como el estrés del retículo endoplasmático o estímulos extrínsecos tales como la unión al receptor de FasL o FNT α . La vía de señalización es compleja, e implica la activación de caspasas tales como la caspasa-3 y la caspasa-9, y de la poli (ADP ribosa) polimerasa (PARP). Durante la cascada, las proteínas de señalización antiapoptóticas, tales como mcl-1 y bcl-x, y miembros de la familia de proteínas IAP, tales como el inhibidor de la apoptosis ligado a X (XIAP), están reguladas negativamente (Budihardjo *et al.* (1999) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15:269-290). Por ejemplo, en las células dendríticas, la señalización celular de CD40 puede bloquear las señales de apoptosis transducidas por FasL (Bjorck *et al.* (1997) *Intl. Immunol.* 9:365-372).

Por lo tanto, el acoplamiento de CD40 por CD40L y la posterior activación de la señalización de CD40 son etapas necesarias para la respuesta inmunitaria normal; sin embargo, la desregulación de la señalización de CD40 puede conducir a la enfermedad. Se ha demostrado que la vía de señalización de CD40 está implicada en la enfermedad autoinmunitaria (Ichikawa *et al.* (2002) *J. Immunol.* 169:2781-2787 y Moore *et al.* (2002) *J. Autoimmun.* 19:139-145). Además, la interacción CD40/CD40L juega un papel importante en los procesos inflamatorios. Por ejemplo, tanto CD40 como CD40L están sobreexpresados en las lesiones ateroscleróticas humana y experimental. La estimulación de CD40 induce la expresión de enzimas que degradan la matriz y la expresión del factor tisular en tipos de células asociadas a ateroma, tales como células endoteliales, células del músculo liso y macrófagos. Además, la estimulación de CD40 induce la producción de citocinas proinflamatorias tales como IL-1, IL-6 e IL-8, y moléculas de adhesión tales como ICAM-1, E-selectina y VCAM. La inhibición de la interacción CD40/CD40L previene la aterogénesis en modelos animales. En los modelos de trasplante, el bloqueo de la interacción CD40/CD40L previene la inflamación. Se ha demostrado que la unión CD40/CD40L actúa sinérgicamente con el péptido beta-amiloide del Alzheimer para promover la activación microglial, lo que conduce a la neurotoxicidad.

En pacientes con artritis reumatoide (AR), la expresión de CD40 está aumentada en los condrocitos articulares, por lo tanto, la señalización de CD40 contribuye probablemente a la producción de metaloproteínasas de matriz y citocinas nocivas. Véase Gotoh *et al.* (2004) *J. Rheumatol.* 31:1506-1512. Además, se ha demostrado que la amplificación de la respuesta inflamatoria sinovial se produce a través de la activación de las MAPK y NF- κ B a través de la ligación de CD40 en las células sinoviales CD14 $^{+}$ de pacientes con AR (Harigai *et al.* (2004) *Arthritis. Rheum.* 50:2167-2177). En un modelo experimental de AR, el tratamiento con anticuerpos anti-CD40L prevenía la inducción de la enfermedad, la inflamación de las articulaciones y la producción de anticuerpos anticolágeno (Durie *et al.* (1993) *Science* 261:1328-1330). Por último, en los ensayos clínicos, se ha demostrado que el empobrecimiento en linfocitos B positivos para CD20 $^{+}$ de los pacientes con AR administrando Rituxan® (indicado generalmente para el linfoma de linfocitos B) mejora los síntomas (Shaw *et al.* (2003) *Ann. Rheum. Dis.* 62 (Supl. 2):ii55-ii59).

También se ha demostrado que el bloqueo de las interacciones CD40/CD40L durante la presentación de antígenos a los linfocitos T induce tolerancia en los linfocitos T. Por lo tanto, el bloqueo de la interacción CD40/CD40L previene la activación inicial de los linfocitos T, además de inducir tolerancia a largo plazo a la reexposición al antígeno.

Los anticuerpos monoclonales anti-CD40 humanos y varios usos de los mismos se describen en las solicitudes de patente del mismo propietario que la presente publicadas como WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307 y WO 2005/044294. Esas solicitudes describen específicamente un anticuerpo monoclonal humano IgG₁ anti-CD40, indicado en las mismas como CHIR-12.12, que se generó por inmunización de ratones transgénicos portadores del locus de la cadena pesada de la IgG₁ humana y el locus de la cadena ligera κ humana (tecnología XenoMouse®; Abgenix, California).

Como se muestra mediante análisis FACS, CHIR-12.12 se une específicamente al CD40 humano y puede evitar la unión del ligando de CD40 (CD40L). CHIR-12.12 puede competir con el CD40L unido previamente al CD40 de superficie celular. El anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 es un antagonista fuerte e inhibe *in vitro* la proliferación dependiente de CD40L de linfocitos B normales y malignos. El anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 inhibe directamente la supervivencia y las vías de señalización dependientes de CD40L en los linfocitos B humanos normales. *In vitro*, CHIR-12.12 destruye las células cancerosas primarias de pacientes con LNH mediante ADCC. Se observó actividad antitumoral dependiente de la dosis en un modelo de xenoinjerto de linfoma humano. CHIR-12.12 se encuentra actualmente en ensayos en fase I para neoplasias de linfocitos B.

CD20 es un antígeno de superficie celular de expresión temprana en la diferenciación de los linfocitos B y que permanece en la superficie celular durante todo el desarrollo de los linfocitos B. CD20 está implicado en la activación de los linfocitos B, se expresa a niveles muy altos en los linfocitos B neoplásicos, y es una diana terapéutica clínicamente reconocida (véase, por ejemplo, Hooijberg *et al.* (1995) Cancer Research 55:2627). Los anticuerpos dirigidos contra CD20, tales como rituximab (Rituxan®), han sido autorizados por la Food and Drug Administration de los EE.UU. para el tratamiento del linfoma no hodgkiniano (véase, por ejemplo, Boye *et al.* (2003) Ann. Oncol. 14:520). Rituxan ha demostrado ser un tratamiento eficaz para el linfoma no hodgkiniano (LNH) de grado de malignidad bajo, intermedio y alto (véase, por ejemplo, Maloney *et al.* (1994) Blood 84:2457-2466), McLaughlin *et al.* (1998) J. Clin. Oncol. 16:2825-2833, Maloney *et al.* (1997) Blood 90:2188-2195, Hainsworth *et al.* (2000) Blood 95:3052-3056, Colombat *et al.* (2001) Blood 97:101-106, Coiffier *et al.* (1998) Blood 92:1927-1932), Foran *et al.* (2000) J. Clin. Oncol. 18:317-324, Anderson *et al.* (1997) Biochem. Soc. Trans. 25:705-708 o Vose *et al.* (1999) Ann. Oncol. 10:58a). Rituxan® también produce el empobrecimiento en linfocitos B normales, lo que puede desempeñar un papel en las enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias. Lo hace en los ensayos clínicos para enfermedades autoinmunitarias.

Aunque no se conoce el mecanismo exacto de acción, las pruebas indican que los efectos de Rituxan® contra el linfoma son, en parte, debidos a la citotoxicidad dependiente de complemento (CMC), la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la inhibición de la proliferación celular y finalmente la inducción directa de la apoptosis. Sin embargo, algunos pacientes se vuelven resistentes al tratamiento con Rituxan® (véase Witzig *et al.* (2002) J. Clin. Oncol. 20:3262, Grillo-López *et al.* (1998) J. Clin. Oncol. 16:2825 o Jazirehi *et al.* (2003) Mol. Cancer Ther. 2:1183-1193). Por ejemplo, algunos pacientes pierden la expresión de CD20 en los linfocitos B malignos después del tratamiento con anticuerpos anti-CD20 (Davis *et al.* (1999) Clin. Cancer Res. 5:611). Además, de un 30% a un 50% de los pacientes con LNH de bajo grado de malignidad no presentan ninguna respuesta clínica a este anticuerpo monoclonal (Hainsworth *et al.* (2000) Blood 95:3052-3056; Colombat *et al.* (2001) Blood 97:101-106). También se ha demostrado que la actividad clínica de rituximab en el LNH se correlaciona con el genotipo de FcγRIIIa del paciente. Los pacientes con el polimorfismo FcγRIIIa-aa158 de V/V o V/F son más sensibles a rituximab que aquellos con F/F (por ejemplo, véase Cartron *et al.* (2002) Blood 99(3):754-758 o Dall'Ozzo *et al.* (2004) Cancer Res. 64:4664-4669). Para los pacientes que desarrollan resistencia a este anticuerpo monoclonal, o con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria resistente al tratamiento inicial con este anticuerpo, se necesitan formas alternativas de intervención terapéutica.

Además, Rituxan® produce en los pacientes el empobrecimiento en linfocitos B normales. Por lo tanto, puede utilizarse para tratar enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias dependientes de linfocitos B.

Existe por lo tanto una continua necesidad de nuevos agentes terapéuticos y nuevas estrategias terapéuticas para las enfermedades inflamatorias y las enfermedades autoinmunitarias. En concreto, existe la necesidad de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de los pacientes resistentes al tratamiento con anticuerpos anti-CD20, tal como rituximab (Rituxan®). Law *et al.* (Cancer Res. 2005; 65:18) ilustra el uso de anticuerpos anti-CD40 para su uso en el tratamiento del linfoma no hodgkiniano.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona un anticuerpo anti-CD40, para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40 en un paciente humano homocigótico o heterocigótico para FcγRIIIa-158F (genotipo F/F o V/F), en el que dicho anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en :

- a) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 producido por 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 epítopo que comprende los restos 82-87 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID N°:7 o la SEQ ID N°:9; y
- c) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 producido por 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 terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40 en un paciente humano homocigótico o heterocigótico para FcγRIIIa-158F (genotipo F/F o V/F), en el que dicho anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en:

- a) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 producido por 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 epítopo que comprende los restos 82-87 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID N°:7 o la SEQ ID N°:9; y

- c) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como depósito de patente Nº PTA-5543 en un ensayo de unión competitiva.
- 5 La invención también proporciona un método para seleccionar un tratamiento con anticuerpos para tratar a un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria que es resistente al tratamiento con rituximab (Rituxan®), que comprende determinar el genotipo (V/V, V/F o F/F) de FcγRIIIa-158 de un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40 y que es resistente al tratamiento con rituximab (Rituxan®) utilizando una muestra biológica obtenida del paciente humano;
- 10 en el que si dicho paciente humano es homocigótico o heterocigótico para FcγRIIIa-158F (genotipo F/F o V/F), se selecciona un anticuerpo anti-CD40 para tratar dicha enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria, en el que dicho anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en:
- 15 a) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como depósito de patente Nº PTA-5543;
- b) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo que comprende los restos 82-87 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID Nº:7 o la SEQ ID Nº:9; y
- 20 c) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como depósito de patente Nº PTA-5543 en un ensayo de unión competitiva.

BREVE RESUMEN DE LA DESCRIPCIÓN

25 Se describen métodos para tratar a un paciente humano de una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40, en los que el paciente humano es homocigótico o heterocigótico para FcγRIIIa-158F (genotipo F/F o V/F). Los métodos comprenden administrar al paciente humano una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40. La invención proporciona el uso de una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40 en un paciente humano homocigótico o heterocigótico para FcγRIIIa-158F (genotipo F/F o V/F).

35 También se describen métodos para inhibir la producción de anticuerpos por los linfocitos B en un paciente humano homocigótico o heterocigótico para FcγRIIIa-158F (genotipo F/F o V/F), que comprenden administrar al paciente humano una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD40. También se describe el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD40 en la fabricación de un medicamento para inhibir la producción de anticuerpos por los linfocitos B en un paciente humano homocigótico o heterocigótico para FcγRIIIa-158F (F/F o V/F).

40 También se describen métodos y kits para identificar a un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria que puede tratarse con un anticuerpo anti-CD40 y que es resistente al tratamiento con rituximab (Rituxan®). En algunas formas de realización, los métodos comprenden: a) identificar a un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40 y que es resistente al tratamiento con rituximab (Rituxan®); y b) determinar el genotipo de FcγRIIIa-158 del paciente humano (V/V, V/F o F/F); en los que la enfermedad inflamatoria o la enfermedad autoinmunitaria puede tratarse con un anticuerpo anti-CD40 humano si el paciente es homocigótico o heterocigótico para FcγRIIIa-158F (genotipo F/F o V/F). La descripción puede incluir adicionalmente la etapa de administrar a un paciente humano identificado utilizando el presente método, una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40. Los kits de la descripción que permiten identificar a un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria que puede tratarse con un anticuerpo anti-CD40 comprenden reactivos para determinar el genotipo de FcγRIIIa-158 de un paciente humano.

55 También se describen métodos y kits para seleccionar un tratamiento con anticuerpos para tratar a un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria que es resistente al tratamiento con rituximab (Rituxan®). En algunas formas de realización, los métodos comprenden: a) identificar a un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40 y que es resistente al tratamiento con rituximab (Rituxan®); y b) determinar el genotipo de FcγRIIIa-158 del paciente humano (V/V, V/F o F/F); en los que si el paciente humano es homocigótico o heterocigótico para FcγRIIIa-158F (genotipo F/F o V/F), se selecciona un anticuerpo anti-CD40 para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria o la enfermedad autoinmunitaria. La descripción puede incluir adicionalmente la etapa de administrar a un paciente humano identificado utilizando el presente método, una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40. Los kits de la descripción que permiten seleccionar un tratamiento con anticuerpos para tratar a un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40 comprenden reactivos para determinar el genotipo de FcγRIIIa-158 de un paciente humano.

65 También se describen métodos para tratar a un paciente humano de una enfermedad inflamatoria o una

enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40, en los que los métodos comprenden administrar al paciente humano un anticuerpo de internalización lenta. En una de tales formas de realización, se administra al paciente humano una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40 de manera que el anticuerpo anti-CD40 no sea internalizado de manera significativa por las células que expresan CD40 después de su administración. En otra de tales formas de realización, se administra al paciente humano una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40 de manera que el anticuerpo anti-CD40 quede distribuido de manera sustancialmente uniforme en la superficie de las células que expresan CD40 después de su administración. En aún otra forma de realización de este tipo, se administra al paciente humano un anticuerpo anti-CD40 de manera que una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz del anticuerpo anti-CD40 esté presente en la superficie de las células que expresan CD40 en el paciente humano después de su administración.

Los anticuerpos anti-CD40 para su uso según la presente invención se unen específicamente al antígeno CD40. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-CD40 para su uso en los métodos de la descripción, en concreto los anticuerpos monoclonales, presentan una fuerte afinidad de unión por el Fc_YRIIIa-158V humano, una fuerte afinidad de unión por el Fc_YRIIIa-158F humano, o una fuerte afinidad de unión por el Fc_YRIIIa-158V humano y por el Fc_YRIIIa-158F humano. En algunas de estas formas de realización, los anticuerpos anti-CD40 pueden unirse a cualquiera de los dos alotipos (V o F) de Fc_YRIIIa-aa158 en los linfocitos citolíticos naturales (NK) de un paciente humano con características de unión adecuadas para provocar una potente citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Los anticuerpos anti-CD40 adecuados incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-CD40 que no tienen actividad agonista significativa, incluidos, por ejemplo, anticuerpos anti-CD40 que son un antagonistas de la señalización de CD40-CD40L en células que expresan CD40. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 está seleccionado del grupo que consiste en: a) el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12; b) el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 12.12; c) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia mostrada en la SEC ID N°:2, la secuencia mostrada en la SEC ID N°:4, la secuencia mostrada en la SEQ ID N°:5, las secuencias mostradas en la SEQ ID N°:2 y en la SEQ ID N°:4, y las secuencias mostradas en la SEQ ID N°:2 y en la SEQ ID N°:5; d) un anticuerpo monoclonal con una secuencia de aminoácidos codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia mostrada en la SEC ID N°: 1, la secuencia mostrada en la SEQ ID N°:3, y las secuencias mostradas en la SEQ ID N°:1 y en la SEQ ID N°:3; e) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 12.12; f) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo que comprende los restos 82-87 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID N°:7 o en la SEQ ID N°:9; g) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo que comprende los restos 82-89 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID N°:7 o en la SEQ ID N°:9; h) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitiva; i) el anticuerpo monoclonal del punto anterior a) o un anticuerpo monoclonal de cualquiera de los puntos anteriores c)-h), en el que el anticuerpo se produce por recombinación; y j) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal de cualquiera de los puntos anteriores a)-i), en el que el fragmento conserva la capacidad de unirse específicamente al antígeno CD40 humano.

Los métodos de la descripción se utilizan en el tratamiento de enfermedades inflamatorias o enfermedades autoinmunitarias asociadas con células que expresan CD40. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan al lupus eritematoso sistémico (LES), el lupus discoide, la nefritis lúpica, la sarcoidosis, la artritis inflamatoria, incluidas la artritis juvenil, la artritis reumatoide, la artritis psoriásica, el síndrome de Reiter, la espondilitis anquilosante y la artritis gotosa, el rechazo de trasplante de órgano o tejido, el rechazo hiperagudo, agudo o crónico y/o la enfermedad de injerto contra hospedador, la esclerosis múltiple, el síndrome de hiper IgE, la poliarteritis nodosa, la cirrosis biliar primaria, la enfermedad inflamatoria intestinal, la enfermedad de Crohn, la enfermedad celíaca (enteropatía sensible al gluten), la hepatitis autoinmunitaria, la anemia perniciosa, la anemia hemolítica autoinmunitaria, la psoriasis, la esclerodermia, la miastenia grave, la púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, la tiroiditis autoinmunitaria, la enfermedad de Grave, la tiroiditis de Hashimoto, la enfermedad por inmunocomplejos, el síndrome de fatiga crónica y disfunción inmunitaria (CFIDS), la polimiositis y la dermatomiositis, la crioglobulinemia, la trombolisis, la cardiomiopatía, el pénfigo vulgar, la fibrosis pulmonar intersticial, la diabetes mellitus de tipo I y tipo II, la hipersensibilidad retardada de tipo 1, 2, 3 y 4, la alergia o los trastornos alérgicos, las respuestas inmunitarias no deseadas/inesperadas a proteínas terapéuticas, el asma, el síndrome de Churg-Strauss (granulomatosis alérgica), la dermatitis atópica, la dermatitis por contacto alérgica e irritante, la urticaria, la alergia dependiente de IgE, la aterosclerosis, la vasculitis, las miopatías inflamatorias idiopáticas, la enfermedad hemolítica, la enfermedad de Alzheimer, y la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, la inflamación pulmonar incluida pero no limitada al rechazo de injerto pulmonar, el asma, la sarcoidosis, el enfisema, la fibrosis quística, la fibrosis pulmonar idiopática, la bronquitis crónica, la rinitis alérgica y las enfermedades alérgicas pulmonares tales como la neumonitis por hipersensibilidad, la neumonía eosinofílica, la bronquiolitis obliterante debida al trasplante de médula ósea y/o pulmón u otras causas, la aterosclerosis del injerto/flebosclerosis del injerto, la fibrosis pulmonar por enfermedades autoinmunitarias, del colágeno y vasculares tales como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso, así como enfermedades inflamatorias o enfermedades autoinmunitarias asociadas con células que expresan CD20. Los métodos de la descripción son especialmente ventajosos con respecto a las enfermedades inflamatorias y a las enfermedades autoinmunitarias asociadas con células que expresan tanto CD40 como CD20. De esta manera, la

descripción permite tratar a pacientes con una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria que no es sensible o que es resistente al tratamiento con otros agentes terapéuticos, incluidos los anticuerpos anti-CD20 para los pacientes que son homocigóticos o heterocigóticos para el Fc γ RIIIa-158F (genotipo F/F o V/F).

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- La Figura 1A-1F muestra los resultados de un análisis de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en seis líneas celulares.
- 10 La Figura 2A-2D muestra los resultados de un análisis de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en células de pacientes con LLC (n = 8).
- La figura 3 resume los resultados de un análisis de ADCC en células de pacientes con LLC (n = 9).
- 15 La figura 4 muestra los resultados de un análisis de ADCC en células de pacientes con LLC, utilizando células efectoras NK de dos donantes diferentes.
- La Figura 5 muestra los resultados de cuantificación de la expresión en la superficie celular de CD40 y CD20 en células de pacientes con LLC y linfocitos B normales.
- 20 La Figura 6 resume la actividad ADCC para las células con expresión en la superficie celular de CD40 y CD20 cuantificada.
- La Figura 7 es un diagrama de barras que muestra los niveles de CHIR-12.12 unido a la superficie celular en líneas celulares Daudi y ARH77.
- 25 La Figura 8 muestra los resultados de la investigación de internalización de CHIR-12.12 y rituximab en células de pacientes con LLC mediante análisis FACS.
- La Figura 9 muestra los resultados de la investigación de internalización de CHIR-12.12 y rituximab en linfocitos B normales mediante microscopía confocal de anticuerpos marcados con FITC.
- 30 La figura 10 muestra los resultados de la investigación de internalización de CHIR-12.12 y rituximab en células de pacientes con LLC mediante microscopía confocal de anticuerpos marcados con Alexa488.
- La Figura 11 resume la relación entre la actividad ADCC y la internalización.
- La Figura 12 es un diagrama de barras que muestra el porcentaje máximo de lisis específica de células Daudi por CHIR-12.12 o rituximab por las células efectoras NK purificadas de donantes con diferentes genotipos del Fc γ RIIIa.
- 35 La Figura 13 es un diagrama de barras que muestra la potencia de ADCC (DE_{50}) de CHIR-12.12 o rituximab en células Daudi por células efectoras NK purificadas de donantes con diferentes genotipos del Fc γ RIIIa.
- La Figura 14 resume la ADCC comparativa de CHIR-12.12 y rituximab contra las células de pacientes con LLC (n = 9) por linfocitos NK humanos de múltiples donantes humanos genotipados.

35 DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los inventores han hecho el sorprendente descubrimiento de que los anticuerpos anti-CD40, tales como CHIR-12.12, son capaces de intervenir en una potente citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de células diana que expresan CD40 en condiciones en las que otros anticuerpos que intervienen en la ADCC son menos eficaces o relativamente ineficaces. A diferencia de otros anticuerpos, tal como rituximab (Rituxan®), los anticuerpos anti-CD40 utilizados según la invención pueden unirse a cualquiera de los dos alotipos (V o F) de Fc γ RIIIa-aa158 en linfocitos citolíticos naturales (NK) de un paciente humano con características de unión que son adecuadas para provocar una ADCC potente. Este descubrimiento es inesperado y representa un avance en nuestra capacidad para tratar las enfermedades inflamatorias y las enfermedades autoinmunitarias en una muestra representativa de pacientes completa.

Por consiguiente, pueden utilizarse anticuerpos anti-CD40, tales como CHIR-12.12, en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias asociadas con células que expresan CD40 en pacientes humanos homocigóticos o heterocigóticos para Fc γ RIIIa-158F (genotipo F/F o V/F), además de pacientes humanos homocigóticos para Fc γ RIIIa-158V (genotipo V/V).

En el presente documento se describe un método para tratar a un paciente humano de una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40, en el que dicho paciente humano es homocigótico o heterocigótico para Fc γ RIIIa-158F (genotipo F/F o V/F), comprendiendo el método administrar a dicho paciente humano una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40. La invención proporciona el uso de una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40 en un paciente humano homocigótico o heterocigótico para Fc γ RIIIa-158F (genotipo F/F o V/F).

Como se ha indicado anteriormente, se ha demostrado que la actividad clínica de rituximab en el LNH se correlaciona con el genotipo de Fc γ RIIIa del paciente. Los pacientes con el polimorfismo Fc γ RIIIa-aa158 de F/F son menos sensibles a rituximab que aquellos con V/V o V/F (por ejemplo, véase Cartron *et al.* (2002) Blood 99(3):754-758 o Dall'Ozzo *et al.* (2004) Cancer Res. 64:4664-4669. Como se ha indicado anteriormente, Rituxan® se encuentra en ensayos clínicos para las enfermedades autoinmunitarias. En consecuencia, la presente invención resulta ventajosa para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias que no son

sensibles al tratamiento con un anticuerpo anti-CD20 tal como rituximab (Rituxan®). Además, tal destrucción potente de las células diana sin la necesidad de utilizar un conjugado de anticuerpo-toxina dará como resultado un fármaco más económico de fabricar y con menos efectos secundarios.

5 Pueden utilizarse anticuerpos anti-CD40, tal como CHIR-12.12, en métodos para inhibir la producción de anticuerpos por los linfocitos B en un paciente humano homocigótico o heterocigótico para FcγRIIIa-158F (genotipo F/F o V/F), además de pacientes humanos homocigóticos para FcγRIIIa-158V (genotipo V/V).

10 En el presente documento se describe un método de inhibición de la producción de anticuerpos por los linfocitos B en un paciente humano homocigótico o heterocigótico para FcγRIIIa-158F (genotipo F/F o V/F), que comprende administrar a dicho paciente humano una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD40, tal como CHIR-12.12. En el presente documento también se describe el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD40 en la fabricación de un medicamento para inhibir la producción de anticuerpos por los linfocitos B en un paciente humano homocigótico o heterocigótico para FcγRIIIa-158F (F/F o V/F).

15 Un experto en la materia no habría esperado que pudiera inhibirse la producción de anticuerpos por los linfocitos B en un paciente humano homocigótico o heterocigótico para FcγRIIIa-158F (genotipo F/F o V/F).

20 La descripción permite basar el régimen de tratamiento seleccionado para un paciente humano individual en ese genotipo de FcγRIIIa-158 del paciente, administrando un anticuerpo anti-CD40 mediador de la ADCC.

25 En el presente documento se describe un método para identificar a un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria que puede tratarse con un anticuerpo anti-CD40 y que es resistente al tratamiento con rituximab (Rituxan®), que comprende:

- 25 a) identificar a un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40 y que es resistente al tratamiento con rituximab (Rituxan®); y
- b) determinar el genotipo de FcγRIIIa-158 de dicho paciente humano (V/V, V/F o F/F);

30 en el que dicha enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria puede tratarse con un anticuerpo anti-CD40 si dicho paciente humano es homocigótico o heterocigótico para FcγRIIIa-158F (genotipo F/F o V/F). La descripción puede incluir adicionalmente la etapa de administrar a un paciente humano identificado utilizando el presente método, una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40.

35 Un experto en la materia puede llevar a cabo fácilmente el presente método de identificación de un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria que puede tratarse con un anticuerpo anti-CD40, utilizando un kit de diagnóstico adecuado. El kit debe comprender reactivos adecuados para determinar el genotipo de FcγRIIIa-158 de un paciente humano. Por lo tanto, también se describe un kit para identificar a un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria que puede tratarse con un anticuerpo anti-CD40, que comprende reactivos para determinar el genotipo de FcγRIIIa-158 de un paciente humano. Los kits adecuados se describen con más detalle en otra parte del presente documento.

40 En el presente documento también se describe un método para seleccionar un tratamiento con anticuerpos para tratar a un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria que es resistente al tratamiento con rituximab (Rituxan®), que comprende:

- 45 a) identificar a un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40 y que es resistente al tratamiento con rituximab (Rituxan®); y
- b) determinar el genotipo de FcγRIIIa-158 de dicho paciente humano (V/V, V/F o F/F);

50 en el que, si dicho paciente humano es homocigótico o heterocigótico para FcγRIIIa-158F (genotipo F/F o V/F), se selecciona un anticuerpo anti-CD40 para tratar dicha enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria. En concreto, puede seleccionarse un anticuerpo anti-CD40 con preferencia al tratamiento con rituximab (Rituxan®). La descripción incluye adicionalmente la etapa de administrar a un paciente humano identificado utilizando el presente método, una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40.

55 Un experto en la materia puede llevar a cabo fácilmente el presente método de selección de un tratamiento con anticuerpos para tratar a un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria, utilizando un kit de diagnóstico adecuado. El kit debe comprender reactivos adecuados para determinar el genotipo de FcγRIIIa-158 de un paciente humano. Por lo tanto, en el presente documento también se describe un kit para seleccionar un tratamiento con anticuerpos para tratar a un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40, que comprende reactivos para determinar el genotipo de FcγRIIIa-158 de un paciente humano.

60 Los inventores también han hecho el sorprendente descubrimiento de que los anticuerpos anti-CD40, tales como CHIR-12.12, no son internalizados de manera significativa por las células que expresan CD40 después de su

administración. En cambio, los anticuerpos anti-CD40, tales como CHIR-12.12, quedan distribuidos de manera sustancialmente uniforme en la superficie de las células que expresan CD40 durante un período de tiempo significativo después de su administración. Esto contrasta con otros anticuerpos, en concreto los anticuerpos anti-CD20, tales como rituximab (Rituxan®).

5 La duración de la unión de CD40 en la superficie de las células que expresan CD40 y la distribución uniforme del anticuerpo anti-CD40 en la superficie de las células que expresan CD40 permite a los anticuerpos anti-CD40 intervenir en una potente citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de las células diana que expresan CD40, a través de la unión a un FcR, tal como el FcγRIIIa en los linfocitos citolíticos naturales (NK).

10 Por lo tanto, en el presente documento se describe un método para tratar a un paciente humano de una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40, comprendiendo el método administrar a dicho paciente humano una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40, de manera que el anticuerpo anti-CD40 no sea internalizado de manera significativa por las células que expresan CD40 después de su administración.

15 En el presente documento también se describe un método para tratar a un paciente humano de una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40, comprendiendo el método administrar a dicho paciente humano una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40, de manera que el anticuerpo anti-CD40 permanezca distribuido de manera sustancialmente uniforme en la superficie de las células que expresan CD40 después de su administración.

20 En el presente documento también se describe un método para tratar a un paciente humano de una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40, comprendiendo el método administrar a dicho paciente humano un anticuerpo anti-CD40, de manera que, tras su administración, esté presente en la superficie de las células que expresan CD40 en dicho paciente humano una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz del anticuerpo anti-CD40.

25 Por lo tanto, estos aspectos de la descripción implican administrar a un paciente un anticuerpo de internalización lenta. "Anticuerpo de internalización lenta" se refiere a un anticuerpo que permanece dispuesto en la superficie celular durante un período de tiempo significativo. Como sabrá el experto en la materia, esta propiedad contrasta con las propiedades que se consideran ventajosas para muchas aplicaciones terapéuticas que realmente requieren la internalización de los complejos anticuerpo-receptor para que el tratamiento sea eficaz. En este contexto, un período de tiempo significativo supera generalmente las 3 horas, preferentemente las 6 horas, más preferentemente las 12 horas, más preferentemente las 24 horas, 36 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 120 horas, 144 horas, 168 horas o más.

30 Preferentemente, al menos un 5%, al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, o más del anticuerpo dispuesto inicialmente en la superficie de una célula que expresa CD40 permanece dispuesto en la superficie celular después del período de tiempo significativo anteriormente indicado.

35 Puede evaluarse la internalización de anticuerpos mediante diversos ensayos. Por ejemplo, pueden utilizarse líneas celulares tales como la línea celular de linfoma Daudi o la línea celular ARH77 MM, para evaluar el efecto sobre la internalización de la unión de un anticuerpo candidato. Las células se incuban con IgG1 humana (anticuerpo testigo) o el anticuerpo candidato en hielo (con azida de sodio al 0,1% para bloquear la internalización) o a 37°C (sin azida de sodio) durante un período de tiempo, convenientemente 3 horas. Después de un lavado con tampón de tinción frío (por ejemplo, PBS + BSA al 1% + azida de sodio al 0,1%), se tiñen las células, por ejemplo con FITC-IgG antihumano de cabra durante 30 minutos en hielo. A continuación, puede evaluarse el grado de tinción; en este ejemplo, puede registrarse la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (MFI), por ejemplo mediante FACS Calibur. Los expertos en la materia conocerán otros ensayos adecuados (véase, por ejemplo <http://www.abgenix.com/documents/SBS2003%20poster.pdf>).

40 En los experimentos que se presentan en los Ejemplos 4 y 5 del presente documento, no se observó ninguna diferencia en la MFI entre las células incubadas con CH12.12 en hielo en presencia de azida de sodio o a 37°C en ausencia de azida de sodio (véanse las Figuras 7-10). Estos datos demuestran que CH12.12, tras la unión a CD40, no se internaliza y se mantiene expuesto en la superficie celular.

45 Más adelante se proporciona un resumen de las técnicas y procedimientos convencionales que pueden emplearse con el fin de utilizar la invención. Se entenderá que la presente invención no se limita a la metodología, protocolos, líneas celulares, vectores y reactivos concretos descritos. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el fin de describir formas de realización concretas solamente y no se pretende que esta terminología limite el alcance de la presente invención. El alcance de la invención sólo está limitado por los términos de las reivindicaciones adjuntas.

50 En la presente memoria descriptiva se utilizan abreviaturas convencionales para los nucleótidos y los

aminoácidos.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, tecnología de ADN recombinante e inmunología, que están dentro del dominio de los expertos en la materia.

Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Los ejemplos de textos particularmente adecuados para su consulta incluyen los siguientes: Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning; A Laboratory Manual (2^a ed.); D.N. Glover, ed. (1985) DNA Cloning, Volúmenes I y II; M.J. Gait, ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis; B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984) Nucleic Acid Hybridization; B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984) Transcription and Translation; R.I. Freshney, ed. (1986) Animal Cell Culture; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal (1984) A Practical Guide to Molecular Cloning; la serie Methods in Enzymology (Academic Press, Inc), especialmente los volúmenes 154 y 155; J.H. Miller y M.P. Calos, eds. (1987) Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Cold Spring Harbor Laboratory); Mayer y Walker, eds. (1987) Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, London); Scopes (1987) Protein Purification: Principles and Practice (2^a ed.; Springer Verlag, N.Y); y D.M. Weir y C. C. Blackwell, eds. (1986) Handbook of Experimental Immunology, volúmenes I-IV.

Los métodos descritos en el presente documento implican el uso de anticuerpos anti-CD40 en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias asociadas con células que expresan CD40.

"CD40", "antígeno CD40" o "receptor CD40" se refieren a la glicoproteína transmembrana de 50-55 kDa de la familia de receptores del factor necrosis tumoral (FNT) (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 5.674.492 y 4.708.871; Stamenkovic *et al.* (1989) EMBO 8:1403; Clark (1990) Tissue Antigens 36:33; Barclay *et al.* (1997) The Leucocyte Antigen Facts Book (2^a ed.; Academic Press, San Diego)). Se han identificado dos isoformas de CD40 humano, codificadas por variantes de transcripción empalmadas alternativamente de este gen. La primera isoforma (también conocida como la "isoforma larga" o "isoforma 1") se expresa como un polipéptido precursor de 277 aminoácidos (SEQ ID Nº:9; descrita por primera vez como con el Nº de registro del GenBank CAA43045, e identificada como isoforma 1 en el Nº de registro del GenBank NP_001241), codificado por la SEC ID Nº:8 (véanse los números de registro del GenBank X60592 y NM_001250), que tiene una secuencia señal representada por los primeros 19 restos. La segunda isoforma (también conocida como la "isoforma corta" o "isoforma 2") se expresa como un polipéptido precursor de 203 aminoácidos (SEQ ID Nº:7; Nº de registro del GenBank NP_690593), codificado por la SEC ID Nº:6 (Nº de registro del GenBank NM_152854), que también tiene una secuencia señal representada por los primeros 19 restos. Los polipéptidos precursores de estas dos isoformas de CD40 humano tienen en común sus primeros 165 restos (es decir, los restos 1-165 de la SEQ ID Nº:7 y la SEQ ID Nº:9). El polipéptido precursor de la isoforma corta (mostrado en la SEC ID Nº:7) es codificado por una variante de transcripción (SEC ID Nº:6) que carece de un segmento codificante, lo que conduce a un cambio del marco de traducción; la isoforma de CD40 resultante contiene un extremo C-terminal más corto y distinto (restos 166-203 de la SEC ID Nº:7) del contenido en la isoforma larga de CD40 (extremo C-terminal mostrado en los restos 166-277 de la SEC ID Nº:9). Para los fines de la presente invención, el término "CD40", o la expresión "antígeno CD40", "antígeno CD40 de superficie celular" o "receptor CD40" abarcan las isoformas corta y larga de CD40. El antígeno CD40 puede estar total o parcialmente glicosilado.

Como se ha indicado en otra parte del presente documento, el CD40 se encuentra en la superficie de los linfocitos B humanos normales y neoplásicos, las células dendríticas, los monocitos, los macrófagos, los linfocitos T CD8⁺, las células endoteliales, las células epiteliales y monocíticas, los linfocitos T activados, las plaquetas activadas, las células inflamadas del músculo liso vascular, los eosinófilos, las membranas sinoviales en la artritis reumatoide, los fibroblastos dérmicos y otros tipos de células no linfoides.

"Células que expresan CD40", en el presente documento, se refiere a cualquier célula normal o maligna que expresa niveles detectables del antígeno CD40. Preferentemente, las células que expresan CD40 son células que expresan niveles detectables de antígeno CD40 de superficie celular. Los métodos para detectar la expresión de CD40 en las células son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, técnicas de PCR, inmunohistoquímica, citometría de flujo, transferencia de western, ELISA, y similares. Estos métodos permiten detectar el ARNm de CD40, el antígeno CD40 y el antígeno CD40 de superficie celular. La detección de la expresión de CD40 de superficie celular puede realizarse como se describe en el Ejemplo 3 del presente documento, o mediante otros métodos adecuados.

"Ligando de CD40" o "CD40L" se refiere principalmente a la proteína transmembrana de 32-33 kDa que también existe en dos formas solubles biológicamente activas más pequeñas, de 18 kDa y 31 kDa, respectivamente (Graf *et al.* (1995) Eur. J. Immunol. 25:1749-1754; Mazzei *et al.* (1995) J. Biol. Chem. 270:7025-7028; Pietravalle *et al.* (1996) J. Biol. Chem. 271:5965-5967). El CD40L humano se conoce también como CD154 o gp39. "Ligando de CD40" o "CD40L" se refiere también a cualquier otro péptido, polipéptido o proteína que puede unirse a y activar una o más vías de señalización de CD40. Por lo tanto, "ligandos de CD40" incluye, pero no se limita a, proteínas ligando de CD40 de longitud completa y variantes y fragmentos de las mismas que conservan suficiente actividad para llevar a cabo la función de unión a y estimulación de la señalización de CD40 en las células que expresan CD40. Las modificaciones en un ligando de CD40 nativo, por ejemplo, el CD40L humano, incluyen pero no se limitan a,

sustituciones, delecciones, truncamientos, extensiones, proteínas de fusión, fragmentos, peptidomiméticos, y similares.

5 “Señalización de CD40” se refiere a cualquiera de las actividades biológicas que son el resultado de la interacción del CD40 de superficie celular con un ligando de CD40 u otro agonista, tal como un anticuerpo agonista. Los ejemplos de señalización de CD40 son señales que conducen a la proliferación y la supervivencia de las células que expresan CD40, y la estimulación de una o más vías de señalización de CD40 en las células que expresan CD40. Una “vía de señalización” o “vía de transducción de señales” de CD40 se refiere a al menos una reacción bioquímica, o un grupo de reacciones bioquímicas, que es el resultado de la interacción del receptor CD40 con un ligando de CD40, por ejemplo, CD40L, y que genera una señal que, cuando se transmite a través de la vía de señalización, conduce a la activación de una o más moléculas corriente abajo en la cascada de señalización. Las vías de transducción de señales involucran varias moléculas de transducción de señales que conducen a la transmisión de una señal desde el receptor de superficie celular CD40 a través de la membrana plasmática de una célula, y a través de una o más de varias moléculas de transducción de señales, a través del citoplasma celular, y en algunos casos, al interior del núcleo celular. Resultan de especial interés para la presente invención las vías de transducción de señales de CD40, incluidas la vía de señalización de AKT, que conduce a la activación de AKT, y en última instancia, a la activación de NF- κ B a través de la vía de señalización de NF- κ B; y las vías de señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), incluida la vía de señalización de MEK/ERK y la vía de señalización de MEK/p38, que conducen a la activación de ERK y p38, respectivamente.

10 Como se ha indicado anteriormente, en el presente documento se describe un método para tratar a un paciente humano de una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40, en el que dicho paciente humano es homocigótico o heterocigótico para Fc γ RIIIa-158F (genotipo F/F o V/F), comprendiendo el método administrar a dicho paciente humano una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40.

15 “Paciente humano” se refiere a un paciente humano aquejado de, que corre el riesgo de desarrollar o sufrir una recaída de, cualquier enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40.

20 Como se ha indicado anteriormente, en el presente documento se describe un método para tratar a un paciente humano de una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40, en el que dicho paciente humano es homocigótico o heterocigótico para Fc γ RIIIa-158F (genotipo F/F o V/F), comprendiendo el método administrar a dicho paciente humano una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40.

25 “Enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40” se refiere a cualquier enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40. La enfermedad inflamatoria o la enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40 puede ser una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con un nivel indeseable de señalización de CD40 en las células que expresan CD40, o la enfermedad inflamatoria o la enfermedad autoinmunitaria podría estar sólo indirectamente asociada con células que expresan CD40. “Una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con un nivel indeseable de señalización de CD40” se refiere a una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria cuyo desarrollo o evolución se asocia con un nivel indeseable de señalización de CD40.

30 “Un nivel indeseable de señalización de CD40” se refiere a cualquier nivel fisiológicamente indeseable de señalización de CD40 que pueda producirse en las células que expresan CD40 en un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria.

35 “Enfermedad inflamatoria” incluye cualquier proceso inflamatorio inmunomediado, en el que el desencadenante o diana de la respuesta inmunitaria involucra antígeno(s) no propio(s), incluidos, por ejemplo, aloantígenos, xenoantígenos, antígenos virales, antígenos bacterianos, antígenos desconocidos o alérgenos.

40 “Autoinmunidad” se refiere a la respuesta inmunitaria dirigida contra los propios tejidos y órganos del organismo. “Autoinmunidad” incluye cualquier respuesta inmunitaria dirigida contra el tejido o órganos del organismo que no es dirigida contra un agente extraño o patógeno.

45 Las enfermedades inflamatorias se caracterizan por la inflamación y la destrucción del tejido, o una combinación de los mismos. “Enfermedad inflamatoria” incluye cualquier proceso inflamatorio inmunomediado, en el que el desencadenante o diana de la respuesta inmunitaria involucra antígeno(s) no propio(s), incluidos, por ejemplo, aloantígenos, xenoantígenos, antígenos virales, antígenos bacterianos, antígenos desconocidos o alérgenos.

50 Tal como se utiliza en el presente documento, se entiende en general que el término “autoinmunidad” abarca los procesos inflamatorios inmunomediados que involucran antígenos “propios”. En las enfermedades autoinmunitarias, antígeno(s) propio(s) activa(n) las respuestas inmunitarias del hospedador.

55 La presente descripción puede utilizarse en el tratamiento de la inflamación asociada con el rechazo de trasplante de tejido. “Rechazo de trasplante” o “rechazo de injerto” se refiere a cualquier respuesta inmunitaria puesta en marcha por el hospedador contra un injerto, incluidos pero no limitados a, antígenos HLA, antígenos de grupo sanguíneo, y similares.

60 La descripción también puede utilizarse para tratar la enfermedad de injerto contra hospedador, tal como la asociada con el trasplante de médula ósea, por ejemplo. En tal la enfermedad de injerto contra hospedador, la médula ósea del donante incluye linfocitos y células que maduran a linfocitos. Los linfocitos del donante reconocen los antígenos del receptor como no propios y ponen en marcha una respuesta inmunitaria inflamatoria. Por lo tanto, tal como se utiliza en el presente documento, “enfermedad de injerto contra hospedador” o “reacción de injerto contra hospedador” se refiere a cualquier respuesta inmunitaria dependiente de linfocitos T, en la que los linfocitos del donante reaccionan a los antígenos del hospedador.

Las enfermedades inflamatorias y las enfermedades autoinmunitarias que pueden tratarse según los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan al lupus eritematoso sistémico (LES), el lupus discoide, la nefritis lúpica, la sarcoidosis, la artritis inflamatoria, incluida la artritis juvenil, la artritis reumatoide, la artritis psoriásica, el síndrome de Reiter, la espondilitis anquilosante y la artritis gotosa, el rechazo de trasplante de un órgano o tejido, el rechazo hiperagudo, agudo o crónico y/o la enfermedad de injerto contra hospedador, la esclerosis múltiple, el síndrome de hiper IgE, la poliarteritis nodosa, la cirrosis biliar primaria, la enfermedad inflamatoria intestinal, la enfermedad de Crohn, la enfermedad celíaca (enteropatía sensible al gluten), la hepatitis autoinmunitaria, la anemia perniciosa, la anemia hemolítica autoinmunitaria, la psoriasis, la esclerodermia, la miastenia grave, la púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, la tiroiditis autoinmunitaria, la enfermedad de Grave, la tiroiditis de Hashimoto, la enfermedad por inmunocomplejos, el síndrome de fatiga crónica y disfunción inmunitaria (CFIDS), la polimiositis y la dermatomiositis, la crioglobulinemia, la trombolisis, la cardiomiopatía, el pénfigo vulgar, la fibrosis pulmonar intersticial, la diabetes mellitus tipo I y tipo II, la hipersensibilidad retardada de tipo 1, 2, 3 y 4, la alergia o los trastornos alérgicos, las respuestas inmunitarias no deseadas/inesperadas a proteínas terapéuticas (véanse, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. Nº US 2002/0119151 y Koren, et al. (2002) Curr. Pharm. Biotechnol. 3:349-60), el asma, el síndrome de Churg-Strauss (granulomatosis alérgica), la dermatitis atópica, la dermatitis por contacto alérgica e irritante, la urticaria, la alergia dependiente de IgE, la aterosclerosis, la vasculitis, las miopatías inflamatorias idiopáticas, la enfermedad hemolítica, la enfermedad de Alzheimer, la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, y similares. Los métodos de la descripción también resultan útiles en el tratamiento de la inflamación pulmonar, incluida pero no limitada al rechazo de injerto pulmonar, el asma, la sarcoidosis, el enfisema, la fibrosis quística, la fibrosis pulmonar idiopática, la bronquitis crónica, la rinitis alérgica y las enfermedades alérgicas pulmonares tales como la neumonitis por hipersensibilidad, la neumonía eosinofílica, la bronquiolitis obliterante debida al trasplante de médula ósea y/o pulmón u otras causas, la aterosclerosis del injerto/flebosclerosis del injerto, así como la fibrosis pulmonar por enfermedades autoinmunitarias, del colágeno y vasculares tales como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso.

La enfermedad inflamatoria o la enfermedad autoinmunitaria pueden ser una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40. Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias dependientes de anticuerpos incluyen la artritis reumatoide, la psoriasis, el lupus eritematoso sistémico, la enfermedad de Crohn, la miastenia grave, la púrpura trombocitopénica idiopática o el síndrome de Sjogren.

Además, el empobrecimiento en linfocitos B y otras células portadoras de CD40 podría limitar la activación de los linfocitos T mediante la señalización a través de la unión al ligando de CD40. Por lo tanto, podría utilizarse el empobrecimiento en linfocitos B y otras células portadoras de CD40 para tratar las enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias dependientes de linfocitos T, tales como la esclerosis múltiple, el rechazo de injerto, la enfermedad de injerto contra hospedador, la enfermedad de Alzheimer o la diabetes. También podría resultar útil para los trasplantes de médula ósea.

La presente invención resulta especialmente ventajosa con respecto a las enfermedades inflamatorias y las enfermedades autoinmunitarias asociadas con células que expresan CD40. Puede utilizarse CHIR-12.12, descrito en el presente documento, para tratar a pacientes con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria que es resistente al tratamiento con otros agentes terapéuticos, incluidos los anticuerpos anti-CD20, tales como Rituxan®, como se describe con más detalle en otra parte del presente documento.

“Tratamiento” se define en el presente documento como la aplicación o administración a un sujeto de un anticuerpo anti-CD40, o la aplicación o administración de un anticuerpo anti-CD40 a una línea celular o tejido aislado de un sujeto, en el que el sujeto tiene una enfermedad autoinmunitaria y/o una enfermedad inflamatoria, un síntoma asociado con una enfermedad autoinmunitaria y/o una enfermedad inflamatoria, o una predisposición a desarrollar una enfermedad autoinmunitaria y/o una enfermedad inflamatoria, en el que el fin es curar, sanar, mitigar, aliviar, modificar, remediar, recuperarse de, mejorar o influir en la enfermedad autoinmunitaria y/o la enfermedad inflamatoria, cualquier síntoma asociado de la enfermedad autoinmunitaria y/o la enfermedad inflamatoria, o la predisposición a desarrollar la enfermedad autoinmunitaria y/o la enfermedad inflamatoria. “Tratamiento” también se refiere a la aplicación o administración a un sujeto de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CD40, o la aplicación o administración a una línea celular o tejido aislado de un sujeto de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CD40, en el que el sujeto tiene una enfermedad autoinmunitaria y/o una enfermedad inflamatoria, un síntoma asociado con una enfermedad autoinmunitaria y/o una enfermedad inflamatoria, o una predisposición a desarrollar una enfermedad autoinmunitaria y/o una enfermedad inflamatoria, en el que el fin es curar, sanar, mitigar, aliviar, modificar, remediar, recuperarse de, mejorar o influir en la enfermedad autoinmunitaria y/o la enfermedad inflamatoria, cualquier síntoma asociado de la enfermedad autoinmunitaria y/o la enfermedad inflamatoria, o la predisposición a desarrollar la enfermedad autoinmunitaria y/o la enfermedad inflamatoria.

“Actividad antiinflamatoria” se refiere a una reducción o prevención de la inflamación. El tratamiento con un anticuerpo anti-CD40 como se define en otra parte del presente documento provoca una respuesta fisiológica que es beneficiosa con respecto al tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria y/o una enfermedad inflamatoria, en el que la enfermedad involucra células que expresan el antígeno CD40. Se reconoce que los métodos descritos en el

presente documento pueden resultar útiles para prevenir el cambio fenotípico en las células, tales como la proliferación, la activación, y similares.

5 En los métodos terapéuticos de la presente invención, se utiliza al menos un anticuerpo anti-CD40 como se define en otra parte del presente documento para promover una respuesta terapéutica positiva con respecto a una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria.

10 "Respuesta terapéutica positiva" con respecto a una enfermedad inflamatoria y/o enfermedad autoinmunitaria se refiere a una mejora de la enfermedad asociada a la actividad antiinflamatoria del anticuerpo, y/o una mejora de los síntomas asociados con la enfermedad. Es decir, puede observarse un efecto antiproliferativo, la prevención de la proliferación adicional de la célula que expresa CD40, una reducción de la respuesta inflamatoria incluida pero no limitada a la reducción de la secreción de citocinas inflamatorias, moléculas de adhesión, proteasas, inmunoglobulinas (en los casos en los que la célula portadora de CD40 sea un linfocito B), combinaciones de los mismos, y similares, aumento de la producción de proteínas antiinflamatorias, una reducción del número de células autorreactivas, un aumento de la tolerancia inmunitaria, inhibición de la supervivencia de las células autorreactivas, y/o una disminución de uno o más síntomas dependientes de la estimulación de las células que expresan CD40. Tales respuestas terapéuticas positivas no se limitan a la vía de administración y pueden comprender la administración al donante, al tejido del donante (tal como, por ejemplo, la perfusión de órganos), al hospedador, cualquier combinación de las mismas, y similares.

15 20 Puede evaluarse la respuesta clínica utilizando técnicas de detección tales como la exploración por resonancia magnética (RM), formación de imágenes de rayos X, exploración por tomografía computarizada (TC), análisis por citometría de flujo o separación de células activadas por fluorescencia (FACS), histología, patología clínica y análisis hematológicos, incluidos pero no limitados a cambios detectables por ELISA, RIA, cromatografía, y similares. Tales respuestas terapéuticas positivas no se limitan a la vía de administración y pueden comprender la administración al donante, al tejido del donante (tal como, por ejemplo, la perfusión de órganos), al hospedador, cualquier combinación de las mismas, y similares.

25 30 "Dosis terapéuticamente o profilácticamente eficaz" o "cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad de anticuerpo anti-CD40 que, cuando se administra, provoca una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento de un paciente con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40. Las dosis adecuadas se describen con más detalle en otra parte del presente documento. El método de tratamiento puede comprender una única administración de una dosis terapéuticamente eficaz o múltiples administraciones de una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD40, como se describe con más detalle en otra parte del presente documento.

35 40 45 Los métodos descritos en el presente documento resultan especialmente útiles para tratar enfermedades inflamatorias o enfermedades autoinmunitarias, incluidas las enumeradas anteriormente, que son resistentes a uno o más tratamientos conocidos para las enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias. Tales tratamientos incluyen, pero no se limitan a, cirugía o intervenciones quirúrgicas (por ejemplo, esplenectomía, linfadenectomía, tiroidectomía, plasmaféresis, leucoforsis, trasplante de células, tejidos u órganos, procedimientos intestinales, perfusión de órganos, y similares), radioterapia, tratamientos tales como tratamiento con esteroides y tratamiento no esteroideo, tratamiento hormonal, tratamiento con citocinas, tratamiento con agentes dermatológicos (por ejemplo, agentes tópicos utilizados para tratar afecciones de la piel tales como las alergias, la dermatitis por contacto y la psoriasis), tratamiento inmunosupresor, y otro tratamiento antiinflamatorio con anticuerpos monoclonales, y similares, según se describe con más detalle en otra parte del presente documento. "Resistente" se refiere a que la enfermedad inflamatoria o la enfermedad autoinmunitaria concreta es resistente a, o no responde a, un tratamiento concreto. Una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria puede ser resistente a un tratamiento concreto, ya sea desde el inicio del tratamiento con el tratamiento concreto (es decir, no responde a la exposición inicial al tratamiento), o como resultado del desarrollo de la resistencia al tratamiento, ya sea durante un primer periodo de tratamiento con el tratamiento o durante un periodo de tratamiento posterior con el tratamiento. Por lo tanto, la presente descripción resulta útil para tratar a un paciente humano que es resistente a un tratamiento para enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias, cuando ese paciente humano sea resistente, o no responda, al tratamiento.

50 55 60 65 Los métodos de la presente invención implican el uso de anticuerpos anti-CD40. Los "anticuerpos" son generalmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, 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 los diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera tiene también puentes disulfuro a intervalos regulares. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de varios 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 restos de aminoácidos concretos forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena pesada y ligera. El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables difieren mucho en la secuencia entre los anticuerpos. Las regiones variables confieren especificidad de unión al antígeno. Los dominios

constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la unión al receptor de Fc (FcR), la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos, la iniciación de la citotoxicidad dependiente de complemento y la degranulación de los mastocitos.

5 Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

10 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus "cadenas pesadas", las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas humanas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, epsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Los diferentes isotipos tienen funciones efectoras diferentes. Por ejemplo, los isotipos de IgG1 e IgG3 humanos tienen actividad ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos). Los anticuerpos IgG1, en concreto los anticuerpos IgG1 humanos, resultan especialmente útiles en los métodos de la presente invención.

20 Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos FcyRIII y llevan a cabo la función efectora de citotoxicidad celular dependiente de antígenos (ADCC). Los ejemplos de leucocitos humanos que intervienen en la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, macrófagos, eosinófilos y neutrófilos, siendo preferentes las PBMC y los linfocitos NK. Los anticuerpos con actividad ADCC son por lo general del isotipo IgG1 o IgG3. Adviéntase que además de aislar anticuerpos IgG1 e IgG3, tales anticuerpos mediadores de la ADCC pueden crearse por ingeniería genética a partir de una región variable de un anticuerpo no-ADCC o fragmento de la región variable y una región constante del isotipo IgG1 o IgG3.

30 La expresión "receptor de Fc" o el término "FcR" se utilizan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferente es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferente es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcyRI, FcyRII y FcyRIII, incluidas las variantes alélicas y las formas empalmadas alternativamente de estos receptores. Los receptores FcyRII incluyen FcyRIIA (un "receptor de activación") y FcyRIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplasmáticos. El receptor de activación FcyRIIA contiene un motivo tirosínico de activación de los inmunorreceptores (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor de inhibición FcyRIIB contiene un motivo tirosínico de inhibición de los inmunorreceptores (ITIM) en su dominio citoplasmático (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 *et al.* (1994) Immunomethods 4:25-34, y de Haas *et al.* (1995) J. Lab. Clin. Med 126:330-341. Otros FcR, incluidos los que se identifiquen en el futuro, quedan abarcados por el término "FcR" del presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al.* (1976) J. Immunol. 117:587 y Kim *et al.* (1994) J. Immunol. 142:249 (1994)).

45 El término "anticuerpo" se utiliza en el presente documento en el sentido más amplio y abarca anticuerpos totalmente ensamblados, fragmentos de anticuerpos que conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno CD40 (por ejemplo, Fab, F(ab')₂, Fv, y otros fragmentos), anticuerpos monocatenarios, diacuerpos, híbridos de anticuerpos, anticuerpos híbridos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos humanizados, y similares), y péptidos recombinantes que comprenden los anteriormente indicados. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos polyclonales y monoclonales.

50 Tal como se utiliza en el presente documento "anticuerpo anti-CD40" abarca cualquier anticuerpo que reconoce específicamente el antígeno CD40. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-CD40 para su uso en los métodos de la presente invención, en concreto los anticuerpos anti-CD40 monoclonales, presentan una fuerte afinidad de unión por un único sitio para el antígeno CD40. Tales anticuerpos monoclonales presentan una afinidad por CD40 (K_D) de al menos 10^{-5} M, al menos 3×10^{-5} M, preferentemente al menos 10^{-6} M, o al menos 10^{-7} M, más preferentemente al menos 10^{-8} M, o al menos 10^{-12} M, cuando se mide utilizando un ensayo convencional tal como Biacore™. El análisis Biacore es conocido en la técnica y los detalles se proporcionan en el "BIAapplications handbook". Pueden utilizarse los métodos descritos en el documento WO 01/27160 para modular la afinidad de unión.

60 "Reconoce específicamente" o "se une específicamente a" se refiere a que el anticuerpo anti-CD40 no se une a antígenos no relacionados, tales como el antígeno CD20.

65 En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-CD40 para su uso en los métodos de la presente invención, en concreto los anticuerpos monoclonales, presentan una fuerte afinidad de unión por el FcyRIIIa-158V humano. Preferentemente, un anticuerpo anti-CD40 para su uso en los métodos de la invención se une al

FcyRIIIa-158V humano con una afinidad (K_D) de al menos aproximadamente 0,5 μM cuando se mide utilizando un ensayo convencional tal como Biacore™. Como se describe en el Ejemplo 6 del presente documento, el anticuerpo CHIR-12.12 se une al FcyRIIIa-158V humano con una afinidad (K_D) de 492 nM.

5 En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-CD40 para su uso en los métodos de la presente invención, en concreto los anticuerpos monoclonales, presentan una fuerte afinidad de unión por el FcyRIIIa-158F humano. Preferentemente, un anticuerpo anti-CD40 para su uso en los métodos de la invención se une al FcyRIIIa-158F humano con una afinidad (K_D) de al menos aproximadamente 12 μM cuando se mide utilizando un ensayo convencional tal como Biacore™. Preferentemente, el anticuerpo anti-CD40 para su uso en los métodos de la invención se une al FcyRIIIa-158F humano con una afinidad (K_D) de al menos aproximadamente 10 μM , al menos aproximadamente 8 μM , al menos aproximadamente 6 μM , al menos aproximadamente 5 μM , al menos aproximadamente 4 μM , o al menos aproximadamente 3 μM . Como se describe en el Ejemplo 6 del presente documento, el anticuerpo CHIR-12.12 se une al FcyRIIIa-158F humano con una afinidad (K_D) de 2,8 μM .

10 15 En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-CD40 para su uso en los métodos descritos en el presente documento, en concreto los anticuerpos monoclonales, presentan una fuerte afinidad de unión por el FcyRIIIa-158V humano y por el FcyRIIIa-158F humano. Preferentemente, un anticuerpo anti-CD40 para su uso en los métodos de la invención se une al FcyRIIIa-158V humano con una afinidad (K_D) de al menos aproximadamente 0,5 μM y se une al FcyRIIIa-158F humano con una afinidad (K_D) de al menos aproximadamente 12 μM , cuando se mide utilizando un ensayo convencional tal como Biacore™.

20 Los anticuerpos para su uso en los métodos de la presente invención pueden producirse utilizando cualquier método de producción de anticuerpos adecuado conocido para los expertos en la materia.

25 30 El anticuerpo anti-CD40 utilizado en los métodos de la presente invención puede ser un anticuerpo policlonal. Por lo tanto, pueden prepararse sueros policlónicos mediante métodos convencionales. En general, se utiliza en primer lugar una solución que contiene el antígeno de interés (en este caso, el antígeno CD40) para inmunizar un animal adecuado, preferentemente un ratón, una rata, un conejo o una cabra. Resultan preferentes los conejos y las cabras para la preparación de sueros policlónicos debido al volumen de suero que puede obtenerse y a la disponibilidad de anticuerpos anti-conejo y anti-cabra marcados.

35 Pueden cribarse sueros de animales inmunizados para determinar la reactividad de los anticuerpos contra el antígeno inicial. Pueden aislar los linfocitos de los ganglios linfáticos o esplenocitos y pueden seleccionarse adicionalmente en busca de linfocitos B mediante la selección en busca de células negativas para CD-138 y células positivas para CD-19. En un aspecto, tales cultivos de linfocitos B (BCC) pueden fusionarse a células de mieloma para generar hibridomas como se detalla en el presente documento.

40 45 50 También pueden prepararse sueros policlónicos en un animal transgénico, preferentemente un ratón portador de loci de inmunoglobulinas humanas. En una forma de realización preferente, se utilizan como inmunógeno las células Sf 9 que expresan la proteína de interés (en este caso, el antígeno CD40). La inmunización también puede llevarse a cabo mezclando o emulsionando la solución que contiene el antígeno en solución salina, preferentemente en un adyuvante tal como el adyuvante completo de Freund, e inyectando la mezcla o emulsión por vía parenteral (generalmente por vía subcutánea o por vía intramuscular). Por lo general es suficiente una dosis de 50 μg -200 μg /inyección. La inmunización se refuerza generalmente 2-6 semanas más tarde con una o más inyecciones de la proteína en solución salina, preferentemente utilizando adyuvante incompleto de Freund. Como alternativa, pueden generarse anticuerpos mediante inmunización *in vitro* utilizando métodos conocidos en la técnica, que para los fines de la presente invención se considera equivalente a la inmunización *in vivo*. Los antisueros policlónicos se obtienen por sangrado del animal inmunizado en un recipiente de vidrio o plástico, incubando la sangre a 25°C durante una hora, seguido de incubación a 4°C durante 2-18 horas. El suero se recupera por centrifugación (por ejemplo, 1.000 x g durante 10 minutos). Pueden obtenerse aproximadamente 20 ml-50 ml por sangrado, a partir de conejos.

55 La producción de células Sf 9 (*Spodoptera frugiperda*) se describe en la patente de EE.UU. Nº 6.004.552. En el caso del CD40, en resumen, las secuencias que codifican CD40 humano se recombinaron en un baculovirus utilizando vectores de transferencia. Los plásmidos se cotransfectaron con ADN de baculovirus de tipo silvestre en células Sf 9. Se identificaron las células Sf 9 infectadas con baculovirus recombinantes y se purificaron por clonación.

60 65 El anticuerpo anti-CD40 utilizado en los métodos de la presente invención puede ser un anticuerpo monoclonal. La expresión "anticuerpo monoclonal" (y "mAb") tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. La expresión no está limitada por lo que se refiere a la especie del anticuerpo y no requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método concreto.

A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlónicos, que por lo general incluyen diferentes

anticuerpos que se dirigen contra diferentes determinantes antigenicos (epitopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante (epitopo) en el antígeno.

5 "Epítopo" se refiere a la parte de una molécula antigenica contra la que se produce un anticuerpo y a la que se unirá el anticuerpo. Los epitopos pueden comprender restos lineales de aminoácidos (es decir, los restos dentro del epitopo están dispuestos secuencialmente uno detrás de otro de forma lineal), restos de aminoácidos no lineales (denominados en el presente documento "epitopos no lineales"; estos epitopos no están dispuestos secuencialmente), o restos de aminoácidos lineales y no lineales. Un anticuerpo monoclonal anti-CD40 adecuado para su uso en los métodos de la presente invención será capaz de unirse específicamente a un epitopo del antígeno CD40 humano expresado en la superficie de una célula humana, es decir, un epitopo que está expuesto al exterior de la célula.

10 Los anticuerpos monoclonales a utilizar según la presente invención pueden crearse mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.* (1975) Nature 256:495, o pueden crearse mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 4.816.567). También pueden aislarse anticuerpos monoclonales a partir de bibliotecas de anticuerpos en fagos generadas utilizando las técnicas descritas, por ejemplo, en McCafferty *et al.* (1990) Nature 348:552-554 (1990) y la patente de EE.UU. Nº 5.514.548. Clackson *et al.* (1991) Nature 352:624-628 y Marks *et al.* (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597 describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (rango de nM) por barajado de cadenas (Marks *et al.* (1992) Bio/Technology 10:779-783), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como estrategia para la construcción de bibliotecas muy grandes de fagos (Waterhouse *et al.* (1993) Nucleic. Acids Res. 21:2265-2266). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

15 20 25 En el método tradicional de Kohler *et al.* (1975) Nature 256:495-496, por lo general se inmuniza un ratón con una solución que contiene un antígeno. La inmunización puede llevarse a cabo mezclando o emulsionando la solución que contiene el antígeno en solución salina, preferentemente en un adyuvante tal como el adyuvante completo de Freund, e inyectando la mezcla o emulsión por vía parenteral. Puede utilizarse cualquier método de inmunización conocido en la técnica para obtener los anticuerpos monoclonales de la invención. Después de la inmunización del animal, se retira el bazo (y opcionalmente, varios ganglios linfáticos grandes) y se disocia en células individuales. Pueden cribarse los esplenocitos aplicando una suspensión celular a una placa o pocillo recubierto con el antígeno de interés. Los linfocitos B que expresan la inmunoglobulina unida a la membrana específica para el antígeno se unen a la placa y no se eliminan por aclarado. A continuación, se induce a los linfocitos B resultantes, o a todos los esplenocitos disociados, a fusionarse con células de mieloma para formar hibridomas, y se cultivan en un medio selectivo. Las células resultantes se colocan en placas mediante dilución en serie y se ensayan para determinar la producción de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno de interés (y que no se unen a antígenos no relacionados). A continuación, los hibridomas que secretan el anticuerpo monoclonal seleccionado (mAb) se cultivan *in vitro* (por ejemplo, en frascos de cultivo de tejido o reactores de fibras huecas), o *in vivo* (como líquido ascítico en ratones).

30 35 40 45 En otro aspecto, pueden cribarse adicionalmente cultivos de linfocitos B para determinar la reactividad frente al antígeno inicial, preferentemente. Tal cribado incluye el ensayo inmuonabsorbente ligado a enzimas (ELISA) con la proteína antigenica/diana, un ensayo de competición con anticuerpos conocidos que se unen al antígeno de interés, y la unión *in vitro* a células CHO transfectadas de manera transitoria u otras células que expresan el antígeno diana.

50 55 60 Cuando los anticuerpos anti-CD40 para su uso en los métodos de la invención van a prepararse utilizando métodos de ADN recombinante, el ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma descritas en el presente documento sirven como fuente preferente de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que a continuación se transfecstan en células hospedadoras, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulínica, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra *et al.* (1993) Curr. Opinion in Immunol. 5:256 y Phickthun (1992) Immunol. Revs. 130:151. Como alternativa, puede producirse el anticuerpo en una línea celular tal como una línea celular CHO, como se describe en las patentes de EE.UU. Nº 5.545.403, 5.545.405 y 5.998.144. En resumen, la línea celular se transfecta con vectores capaces de expresar una cadena ligera y una cadena pesada, respectivamente. Pueden producirse anticuerpos híbridos transfecstando las dos proteínas en vectores separados. Otra ventaja es la glicosilación correcta del anticuerpo.

65 Una "célula hospedadora", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un microorganismo o a una línea celular o célula eucariota cultivada como una entidad unicelular que puede ser, o ha sido, utilizada como receptor de un vector recombinante u otros polinucleótidos de transferencia, y que incluye la progenie de la célula original que se ha transfecstado. Se entiende que la progenie de una única célula puede no ser necesariamente

completamente idéntica a la original en su morfología o en su genómica o en su complemento de ADN total, debido a la mutación natural, accidental o deliberada.

En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40, tal como CHIR-12.12, se produce en células CHO utilizando el sistema de expresión de genes GS (Lonza Biologics, Portsmouth, New Hampshire), que utiliza como marcador la glutamina sintetasa. Véanse también las patentes de EE.UU. Nº 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. Véanse, por ejemplo, las secciones dedicadas a los antígenos de linfocitos B en McMichael, ed. (1987; 1989) *Leukocyte Typing III and IV* (Oxford University Press, Nueva York); las patentes de EE.UU. Nº 5.674.492, 5.874.082, 5.677.165, 6.056.959; el documento WO 00/63395; las publicaciones internacionales Nº WO 02/28905 y WO 02/28904; Gordon *et al.* (1988) *J. Immunol.* 140:1425; Valle *et al.* (1989) *Eur. J. Immunol.* 19:1463; Clark *et al.* (1986) *PNAS* 83:4494; Paulie *et al.* (1989) *J. Immunol.* 142:590; Gordon *et al.* (1987) *Eur. J. Immunol.* 17:1535; Jabara *et al.* (1990) *J. Exp. Med.* 172:1861; Zhang *et al.* (1991) *J. Immunol.* 146:1836; Gascan *et al.* (1991) *J. Immunol.* 147:8; Banchereau *et al.* (1991) *Clin. Immunol. Spectrum* 3:8; y Banchereau *et al.* (1991) *Science* 251:70.

Como se ha indicado anteriormente, el término "anticuerpo" tal como se utiliza en el presente documento abarca anticuerpos híbridos. Anticuerpos "híbridos" se refiere a anticuerpos que se derivan lo más preferentemente utilizando técnicas de ácido desoxirribonucleico recombinante y que comprenden componentes humanos (incluidas especies inmunológicamente "relacionadas", por ejemplo, chimpancé) y no humanos. Por lo tanto, la región constante del anticuerpo híbrido es lo más preferentemente sustancialmente idéntica a la región constante de un anticuerpo humano natural; la región variable del anticuerpo híbrido se deriva lo más preferentemente de una fuente no humana y tiene la especificidad antigenica deseada para el antígeno de interés (CD40). La fuente no humana puede ser cualquier fuente de vertebrado que puede utilizarse para generar anticuerpos contra el antígeno CD40. Tales fuentes no humanas incluyen, pero no se limitan a, roedores (por ejemplo, conejo, rata, ratón, etc.; véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 4.816.567) y primates no humanos (por ejemplo, mono del Viejo Mundo, Simio, etc.; véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 5.750.105 y 5.756.096).

Como se ha indicado anteriormente, el término "anticuerpo" tal como se utiliza en el presente documento abarca anticuerpos humanizados. "Humanizado" se refiere a formas de anticuerpos que contienen una secuencia mínima derivada de secuencias de inmunoglobulinas no humanas. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región hipervariable (también conocida como región determinante de complementariedad o CDR) del receptor se sustituyen por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) 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 secuencias de aminoácidos que definen conjuntamente la especificidad y la afinidad de unión de la región Fv natural de un sitio de unión de la inmunoglobulina nativa. Véanse, por ejemplo, Chothia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Kabat *et al.* (1991) U. S. Dept. of Health and Human Services, publicación NIH Nº 91-3242). La expresión "región constante" se refiere a la porción de la molécula de anticuerpo que confiere funciones efectoras. En un trabajo anterior que se refiere a la producción de anticuerpos no inmunogénicos para su uso en el tratamiento de enfermedades humanas, las regiones constantes de ratón se sustituyeron por las regiones constantes humanas. Las regiones constantes de los anticuerpos humanizados objeto se derivaron de inmunoglobulinas humanas. Sin embargo, estos anticuerpos humanizados pueden inducir una respuesta inmunitaria no deseada y potencialmente peligrosa en seres humanos y hubo una pérdida de afinidad.

La humanización puede realizarse siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyen *et al.* (1988) *Science* 239:1534-1536), sustituyendo las secuencias de CDR o las CDR de roedores o de roedores mutantes por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Véanse también las patentes de EE.UU. Nº 5.225.539, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 5.859.205. En algunos casos, los restos dentro de las regiones estructurales de una o más regiones variables de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los restos no humanos correspondientes (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 6.180.370). Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para perfeccionar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo (por ejemplo, para obtener la afinidad deseada). En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y por lo general dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones estructurales son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), por lo general la de una inmunoglobulina humana. Para más información, véanse Jones *et al.* (1986) *Nature* 331:522-525; Riechmann *et al.* (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 humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son por lo general anticuerpos humanos en los que algunos restos de la CDR y posiblemente algunos restos de la región estructural están sustituidos por restos de sitios

análogos en los anticuerpos de roedores. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 5.225.539, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 5.859.205. Véanse también la patente de EE.UU. Nº 6.180.370 y la publicación internacional Nº WO 01/27160, en las que se describen anticuerpos humanizados y técnicas para producir anticuerpos humanizados con afinidad mejorada por un antígeno predeterminado.

5 También pueden producirse anticuerpos anti-CD40 humanizados utilizando la tecnología Human Engineering™ (Xoma Ltd., Berkeley, California).

10 Los anticuerpos monoclonales anti-CD40 humanizados incluyen anticuerpos tales como SGN-40 (Tai *et al.* (2004) Cancer Res. 64:2846-52; patente de EE.UU. Nº 6.838.261), que es la forma humanizada del anticuerpo anti-CD40 murino SGN-14 (Francisco *et al.* (2000) Cancer Res. 60:3225-31), y los anticuerpos descritos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. Nº 2004/0120948.

15 La presente invención también puede practicarse utilizando anticuerpos modificados o xenogénicos producidos en un hospedador mamífero no humano, más concretamente un ratón transgénico, caracterizados por loci inactivados de la inmunoglobulina (Ig) endógena. En tales animales transgénicos, los genes endógenos competentes para la expresión de las subunidades ligera y pesada de las inmunoglobulinas del hospedador se hacen no funcionales y se sustituyen con loci análogos de la inmunoglobulina humana. Estos animales transgénicos producen anticuerpos humanos en ausencia sustancial de las subunidades ligera o pesada de la inmunoglobulina del hospedador. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 5.877.397 y 5.939.598.

20 Por lo tanto, en algunas formas de realización, los anticuerpos totalmente humanos contra CD40, por ejemplo, se obtienen inmunizando ratones transgénicos. Uno de tales ratones se obtiene utilizando la tecnología XenoMouse® (Abgenix; Fremont, California), y se describe en las patentes de EE.UU. Nº 6.075.181, 6.091.001 y 6.114.598. Por ejemplo, para producir el anticuerpo CHIR-12.12, se inmunizaron ratones transgénicos para el locus de la cadena ligera κ humana y el locus de la cadena pesada de la IgG₁ humana con células Sf 9 que expresan CD40 humano. Los ratones también pueden ser transgénicos para otros isotipos. Los anticuerpos anti-CD40 totalmente humanos útiles en los métodos de la presente invención se caracterizan por propiedades de unión similares a las presentadas por el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12.

25 Como se ha indicado anteriormente, el término "anticuerpo" tal como se utiliza en el presente documento también abarca fragmentos de anticuerpos que pueden unirse al antígeno. Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente la región variable o de unión al antígeno del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos 30 lineales (Zapata *et al.* (1995) Protein Eng. 10:1057-1062); moléculas de anticuerpos monocatenarios; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación con el antígeno y es 35 todavía capaz de entrecruzar el antígeno.

40 "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión y reconocimiento del antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena ligera y pesada en asociación estrecha no covalente. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. Colectivamente, las seis CDR confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un solo 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 afinidad menor que el sitio de unión completo.

45 50 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 restos en el extremo carboxilo terminal del dominio C_H1 de la cadena pesada, incluidas una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación, en el presente documento, para Fab' en el que el(s) resto(s) de cisteína de los dominios constantes porta(n) un grupo tiol libre. Los fragmentos Fab' se producen reduciendo el puente disulfuro de la cadena pesada del fragmento F(ab')₂. También se conocen otros acoplamientos químicos de 55 fragmentos de anticuerpos.

60 65 Los fragmentos de un anticuerpo anti-CD40 resultan adecuados para su uso en los métodos de la invención siempre que conserven la afinidad deseada del anticuerpo de longitud completa. Por lo tanto, por ejemplo, un fragmento de un anticuerpo anti-CD40 conservará la capacidad para unirse al antígeno CD40. Tales fragmentos se caracterizan por propiedades similares al anticuerpo de longitud completa correspondiente. Por lo tanto, por ejemplo, un fragmento de un anticuerpo anti-CD40 antagonista de longitud completa será capaz preferentemente de unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expreso en la superficie de una célula humana, y no tiene actividad agonista significativa pero presenta actividad antagonista cuando se unen a un antígeno CD40 en una célula que expresa CD40 humano. Tales fragmentos se denominan en el presente documento fragmentos "de unión a antígeno". Los fragmentos de un anticuerpo anti-CD40 para su uso en los métodos de la invención también

conservarán preferentemente la capacidad de unirse al FcR o a los FcR pertinentes. Por lo tanto, por ejemplo, un fragmento de un anticuerpo anti-CD40 puede conservar la capacidad de unirse a FcγRIIIa. Por lo tanto, por ejemplo, un fragmento de un anticuerpo anti-CD40 de longitud completa puede ser capaz de unirse específicamente a un antígeno CD40 de superficie celular, y también capaz de unirse al FcγRIIIa en las células efectoras humanas, tales como linfocitos citolíticos naturales (NK). Tales fragmentos se denominan en el presente documento fragmentos "de unión a FcR". Tales fragmentos incluirán generalmente al menos una parte del dominio constante de la cadena pesada.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban por medio de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.* (1992) *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan *et al.* (1985) *Science* 229:81). Sin embargo, hoy en día pueden producirse estos fragmentos directamente mediante células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden aislararse de las bibliotecas de anticuerpos en fagos analizadas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse fragmentos Fab'-SH directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.* (1992) *Bio/Technology* 10:163-167). Según otro enfoque, pueden aislarse fragmentos F(ab')₂ directamente del cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos resultarán evidentes para el experto en la materia.

Los fragmentos de unión a antígeno adecuados de un anticuerpo comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región variable o de unión al antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, F(ab')₂ y Fv y moléculas de anticuerpos monocatenarios. "Fab" se refiere a un fragmento monovalente de unión a antígeno de una inmunoglobulina que se compone de la cadena ligera y parte de la cadena pesada. F(ab')₂ se refiere a un fragmento bivalente de unión a antígeno de una inmunoglobulina que contiene ambas cadenas ligeras y parte de ambas cadenas pesadas. Fragmentos de anticuerpos "sFv" o "Fv monocatenario" se refiere a fragmentos que comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 4.946.778, 5.260.203, 5.455.030 y 5.856.456. Generalmente, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite al sFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun (1994) en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, ed. Rosenburg y Moore (Springer-Verlag, Nueva York), págs. 269-315. Los fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos anti-CD40 antagonistas descritos en el presente documento también pueden conjugarse a una citotoxina para destruir las células diana, tal como se describe más adelante en el presente documento.

En algunas formas de realización de la invención, el anticuerpo anti-CD40 es un anticuerpo anti-CD40 antagonista. Cuando tales anticuerpos se unen al CD40 expuesto en la superficie de células humanas, tales como los linfocitos B humanos, no provocan actividad agonista significativa. En algunas formas de realización, su unión al CD40 expuesto en la superficie de células humanas da como resultado la inhibición de la proliferación y la diferenciación de estas células humanas. Los anticuerpos anti-CD40 adecuados para su uso en los métodos de la invención incluyen aquellos anticuerpos que pueden presentar actividad antagonista hacia las células humanas normales y malignas que expresan el antígeno CD40 de superficie celular.

"Actividad agonista" se refiere a una sustancia que funciona como agonista. Un agonista se combina con un receptor en una célula e inicia una reacción o actividad que es similar o la misma que la iniciada por el ligando natural del receptor. Un agonista de CD40 induce cualquiera de o todas, pero sin limitarse a, las siguientes respuestas: proliferación y/o diferenciación de linfocitos B; regulación positiva de la adhesión intercelular por medio de moléculas tales como ICAM-1, E-selectina, VCAM, y similares; secreción de citocinas pro-inflamatorias tales como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, FNT, y similares; transducción de señales a través del receptor CD40 por vías tales como TRAF (por ejemplo, TRAF2 y/o TRAF3), MAP quinasas tales como NIK (quinasa inductora de NF-κB), I-kappa B quinasa (IKK α/β), factor de transcripción NF-κB, Ras y la vía MEK/ERK, la vía PI3K/AKT, la vía P38 MAPK, y similares; transducción de una señal antiapoptótica por moléculas tales como XIAP, mcl-1, bcl-x, y similares; generación de memoria de linfocitos B y/o T; producción de anticuerpos de linfocitos B; cambio de isotipo de linfocitos B, regulación positiva de la expresión en la superficie celular de MHC de clase II y CD80/86, y similares.

Actividad agonista "significativa" se refiere a una actividad agonista al menos un 30%, un 35%, un 40%, un 45%, un 50%, un 60%, un 70%, un 75%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95%, o un 100% superior a la actividad agonista inducida por una sustancia neutra o un testigo negativo según se mide en un ensayo de una respuesta de linfocitos B. Preferentemente, la actividad agonista "significativa" es una actividad agonista que es al menos 2 veces superior o al menos 3 veces superior a la actividad agonista inducida por una sustancia neutra o un testigo negativo según se mide en un ensayo de una respuesta de linfocitos B. Por lo tanto, por ejemplo, cuando la respuesta de linfocitos B de interés es la proliferación de linfocitos B, la actividad agonista "significativa" sería la inducción de un nivel de proliferación de linfocitos B que es al menos 2 veces superior o al menos 3 veces superior al nivel de proliferación de linfocitos B inducida por una sustancia neutra o un testigo negativo. En una forma de realización, una inmunoglobulina no específica, por ejemplo IgG1, que no se une al CD40, sirve como testigo negativo. Una sustancia "que no tiene actividad agonista significativa" presentaría una actividad agonista no más de

aproximadamente un 25% superior a la actividad agonista inducida por una sustancia neutra o un testigo negativo, preferentemente no más de aproximadamente un 20% superior, un 15% superior, un 10% superior, un 5% superior, un 1% superior, un 0,5% superior, o incluso no más de aproximadamente un 0,1% superior a la actividad agonista inducida por una sustancia neutra o un testigo negativo según se mide en un ensayo de una respuesta de linfocitos B.

5 "Actividad antagonista" se refiere a que la sustancia funciona como antagonista. Un antagonista de CD40 previene o reduce la inducción de cualquiera de las respuestas inducidas por la unión del receptor CD40 a un ligando agonista, en concreto CD40L. El antagonista puede reducir la inducción de una o más de las respuestas a la unión del agonista en un 5%, un 10%, un 15%, un 20%, un 25%, un 30%, un 35%, preferentemente un 40%, un 45%, un 50%, un 55%, un 60%, más preferentemente un 70%, un 80%, un 85%, y lo más preferentemente un 90%, un 95%, 99% o un 100%. Los métodos para medir la especificidad de unión del ligando de CD40 y la actividad antagonista de un agente terapéutico anti-CD40, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40, son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, ensayos convencionales de unión competitiva, ensayos para la monitorización de la secreción de inmunoglobulinas por los linfocitos B, ensayos de proliferación de linfocitos B, ensayos de proliferación de linfocitos B de tipo Banchereau, ensayos de linfocitos T cooperadores para la producción de anticuerpos, ensayos de coestimulación de proliferación de linfocitos B, y ensayos para la regulación positiva de marcadores de activación de linfocitos B. Véanse, por ejemplo, tales ensayos descritos en el documento WO 00/75348 y la patente de EE.UU. Nº 6.087.329. Véanse también los documentos WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, 20 WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307 y WO 2005/044294.

10 Puede evaluarse la actividad antagonista/carencia de actividad agonista mediante ensayos que demuestran que CHIR-12.12 carece de actividad agonista. Los ensayos adecuados se muestran en los ensayos descritos en el documento US 5677165 (Chiron Corporation).

15 25 En una forma de realización de la invención, el anticuerpo anti-CD40 antagonista no tiene actividad agonista significativa en una respuesta celular. En otra forma de realización de la invención, el anticuerpo anti-CD40 antagonista no tiene actividad agonista significativa en ensayos de más de una respuesta celular (por ejemplo, proliferación y diferenciación, o proliferación, diferenciación, y, para los linfocitos B, producción de anticuerpos).

20 30 35 Son de especial interés los anticuerpos anti-CD40 antagonistas que no tienen actividad agonista significativa como se define en el presente documento, pero que presentan actividad antagonista cuando se unen al antígeno CD40 en los linfocitos B humanos. En una forma de realización de la invención, el anticuerpo anti-CD40 antagonista no tiene actividad agonista significativa en una respuesta de linfocitos B. En otra forma de realización de la invención, el anticuerpo anti-CD40 antagonista no tiene actividad agonista significativa en ensayos de más de una respuesta de linfocitos B (por ejemplo, proliferación y diferenciación, o proliferación, diferenciación y producción de anticuerpos).

40 45 Puede utilizarse cualquiera de los ensayos conocidos en la técnica para determinar si un anticuerpo anti-CD40 actúa como antagonista de una o más respuestas de linfocitos B. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 actúa como antagonista de al menos una respuesta de linfocitos B seleccionada del grupo que consiste en proliferación de linfocitos B, diferenciación de linfocitos B, producción de anticuerpos, adhesión intercelular, generación de memoria de linfocitos B, cambio de isotipo, regulación positiva de la expresión en la superficie celular de MHC de clase II y CD80/86, y secreción de citocinas pro-inflamatorias tales como IL-8, IL-12 y FNT. Son de especial interés los anticuerpos anti-CD40 antagonistas que no tienen actividad agonista significativa con respecto a la proliferación de linfocitos B cuando se unen al antígeno CD40 humano en la superficie de un linfocito B humano.

50 55 En una de tales formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 es un antagonista de la proliferación de linfocitos B inducida por el CD40L soluble o de superficie celular, según se mide en un ensayo de proliferación de linfocitos B. Los ensayos de proliferación de linfocitos B adecuados son conocidos en la técnica. Preferentemente, el anticuerpo anti-CD40 antagonista estimula la proliferación de linfocitos B a un nivel que no es más de aproximadamente un 25% superior a la proliferación de linfocitos B inducida por una sustancia neutra o un testigo negativo, preferentemente no más de aproximadamente un 20% superior, un 15% superior, un 10% superior, un 5% superior, un 1% superior, un 0,5% superior, o incluso no más de aproximadamente un 0,1% superior a la proliferación de linfocitos B inducida por una sustancia neutra o un testigo negativo.

60 65 En otras formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 es un antagonista de la proliferación de linfocitos B que es inducida por otro anticuerpo anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo anti-CD40 S2C6, según se mide en un ensayo de proliferación de linfocitos B, y el nivel de proliferación de linfocitos B estimulado por el otro anticuerpo anti-CD40 en presencia del anticuerpo anti-CD40 antagonista no es superior a aproximadamente un 25% de la proliferación de linfocitos B inducida por el otro anticuerpo anti-CD40 en ausencia del anticuerpo anti-CD40 antagonista (es decir, al menos un 75% de inhibición), preferentemente no superior a aproximadamente un 20%, un 15%, un 10%, un 5%, un 1%, un 0,5%, o incluso no superior a aproximadamente un 0,1% de la proliferación de linfocitos B inducida por el otro anticuerpo anti-CD40 en ausencia del anticuerpo anti-CD40 antagonista.

En todavía otras formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 es un antagonista de la proliferación de

linfocitos B que es inducida por la línea celular EL4B5 según se mide en un ensayo de activación de linfocitos B, y el nivel de proliferación de linfocitos B estimulada por la línea celular EL4B5 en presencia del anticuerpo anti-CD40 antagonista no es superior a aproximadamente un 25% de la proliferación de linfocitos B inducida por esta línea celular en ausencia del anticuerpo anti-CD40 antagonista (es decir, al menos un 75% de inhibición), preferentemente no superior a aproximadamente un 20%, un 15%, un 10%, un 5%, un 1%, un 0,5%, o incluso no superior a aproximadamente un 0,1% de la proliferación de linfocitos B inducida por esta línea celular en ausencia del anticuerpo anti-CD40 antagonista.

En todavía otras formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 es un antagonista de la producción de anticuerpos por los linfocitos B humanos inducida por linfocitos T humanos según se mide en el ensayo de linfocitos T cooperadores humanos para la producción de anticuerpos por los linfocitos B. De esta manera, el nivel de producción de anticuerpos IgG, producción de anticuerpos IgM, o producción de anticuerpos IgG e IgM por los linfocitos B estimulada por linfocitos T en presencia del anticuerpo anti-CD40 antagonista no es superior a aproximadamente un 50% de la respectiva producción de anticuerpos por los linfocitos B estimulada por linfocitos T en ausencia del anticuerpo anti-CD40 antagonista (es decir, al menos un 75% de inhibición), preferentemente no superior a aproximadamente un 25%, un 20%, un 15%, un 10%, un 5%, un 1%, un 0,5%, o incluso no superior a aproximadamente un 0,1% de la respectiva producción de anticuerpos por los linfocitos B estimulada por linfocitos T en ausencia del anticuerpo anti-CD40 antagonista. Los anticuerpos anti-CD40 antagonistas adicionales incluyen los anticuerpos monoclonales conocidos como 5D12, 3A8 y 3C6, que son secretados por un hibridoma que tienen los números de registro de la ATCC HB 11339, HB 12024 y HB 11340, respectivamente. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 6.315.998.

Los anticuerpos anti-CD40 antagonistas son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, el anticuerpo anti-CD40 humano producido por el hibridoma denominado F4-465 que se describe en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. Nº 20020142358 y Nº 20030059427. Se obtuvo F4-465 a partir del ratón HAC (*Kuroiwa et al.* (2000) *Nature Biotech.* 10:1086 (2000)) y por lo tanto expresa la cadena ligera lambda humana. Véanse también los documentos WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307 y WO 2005/044294.

Además de la actividad antagonista, el anticuerpo anti-CD40 para su uso en los métodos de la presente invención tendrá preferentemente otro mecanismo de acción contra una célula diana. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CD40 tendrá preferentemente actividad ADCC. Como alternativa, las regiones variables del anticuerpo anti-CD40 pueden expresarse en otro isotipo de anticuerpo que tenga actividad ADCC. También es posible conjugar formas nativas, formas recombinantes o fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos anti-CD40 a una citotoxina, un agente terapéutico o un ion de metal radiactivo o un radioisótopo, como se describe adicionalmente en otra parte del presente documento.

Como se explica en otra parte del presente documento, los inventores han hecho el sorprendente descubrimiento de que, contrariamente a otros anticuerpos, los anticuerpos anti-CD40, tales como CHIR-12.12, son capaces de intervenir en una potente citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de las células diana que expresan CD40 por medio de la unión a cualquiera de los dos alotipos (V o F) de Fc_YRIIIa-aa158 en los linfocitos citolíticos naturales (NK) de un paciente humano. En consecuencia, pueden utilizarse anticuerpos anti-CD40, tales como CHIR-12.12, en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias asociadas con células que expresan CD40 en pacientes humanos homocigóticos o heterocigóticos para Fc_YRIIIa-158F (genotipo F/F o V/F), además de los pacientes humanos homocigóticos para Fc_YRIIIa-158V (genotipo V/V). La presente descripción resulta especialmente ventajosa para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias que no son sensibles al tratamiento con rituximab (Rituxan®), porque se ha demostrado que la actividad clínica de rituximab en el LNH se correlaciona con el genotipo de Fc_YRIIIa del paciente.

Por lo tanto, los anticuerpos anti-CD40 especialmente preferentes para su uso en los métodos de la presente invención son aquellos que, además de la actividad antagonista, son capaces de intervenir en la ADCC de las células que expresan CD40 por las células efectoras humanas, tales como los linfocitos citolíticos naturales (linfocitos NK) que expresan Fc_YRIIIa. Los más preferentes son los anticuerpos anti-CD40 que son capaces de unirse tanto a Fc_YRIIIa-158F como a Fc_YRIIIa-158V con alta afinidad, como se describe adicionalmente en otra parte del presente documento.

Los anticuerpos anti-CD40 especialmente preferentes son los descritos en los documentos WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307 y WO 2005/044294.

Son de especial interés para la presente invención los anticuerpos anti-CD40 antagonistas que comparten las características de unión del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 descritas en los documentos WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307 y WO 2005/044294. Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a los siguientes:

- a) el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12;

- 5 b) el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 12.12;
- c) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia mostrada en la SEC ID Nº:2, la secuencia mostrada en la SEC ID Nº:4, la secuencia mostrada en la SEQ ID Nº:5, las secuencias mostradas en la SEQ ID Nº:2 y en la SEQ ID Nº:4; y las secuencias mostradas en la SEQ ID Nº:2 y en la SEQ ID Nº:5;
- 10 d) un anticuerpo monoclonal con una secuencia de aminoácidos codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia mostrada en la SEC ID Nº:1, la secuencia mostrada en la SEQ ID Nº:3, y las secuencias mostradas en la SEQ ID Nº:1 y en la SEQ ID Nº:3;
- 15 e) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 12.12;
- f) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo que comprende los restos 82-87 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID Nº:7 o la SEQ ID Nº:9;
- 20 g) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo que comprende los restos 82-89 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID Nº:7 o la SEQ ID Nº:9;
- 25 h) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitiva;
- i) el anticuerpo monoclonal del punto anterior a) o un anticuerpo monoclonal de cualquiera de los puntos anteriores c)-h), en el que dicho anticuerpo se produce por recombinación; y
- j) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal de cualquiera de los puntos anteriores a)-i), en el que dicho fragmento conserva la capacidad de unirse específicamente a dicho antígeno CD40 humano.

25 El anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 resulta especialmente preferente para su uso en los métodos de la presente invención.

30 El anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 se ha descrito detalladamente en los documentos WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307 y WO 2005/044294. El anticuerpo CHIR-12.12 es un anticuerpo monoclonal anti-CD40 totalmente humano del isotipo IgG₁ producido a partir de la línea celular de hibridoma 153.8E2.D10.D6.12.12 (conocida como línea celular 12.12). La línea celular se creó utilizando esplenocitos de ratones xenotípicos inmunizados que contienen el locus de la cadena κ humana y el locus de la cadena pesada de la IgG₁ humana (tecnología XenoMouse®; Abgenix; Fremont, California). Se fusionaron esplenocitos con células SP2/0 de mieloma de ratón (Sierra BioSource). Los hibridomas resultantes se subclonaron varias veces para crear la línea celular monoclonal estable 12.12. Pueden prepararse otros anticuerpos adecuados para su uso en los métodos de la invención de manera similar utilizando ratones transgénicos para loci de inmunoglobulinas humanas, tal como se describe en otra parte del presente documento.

40 El anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 se une al CD40 soluble en ensayos de tipo ELISA, impide la unión del ligando de CD40 al CD40 de superficie celular, y desplaza el ligando de CD40 previamente unido, según se determina mediante ensayos de citometría de flujo. Los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 compiten entre sí por la unión a CD40 pero no con 15B8, el anticuerpo monoclonal anti-CD40 que se describe en la solicitud provisional de EE.UU. con Nº de serie 60/237.556, titulada "Human Anti-CD40 Antibodies" presentada el 2 de octubre de 2000, y la solicitud internacional PCT Nº PCT/US01/30857, titulada también "Human Anti-CD40 Antibodies", presentada el 2 de octubre de 2001 (número de expediente del mandatario PP16092.003) y publicada como WO 2002/028904. Cuando se ensaya *in vitro* para determinar los efectos sobre la proliferación de linfocitos B de sujetos humanos normales, CHIR-12.12 actúa como anticuerpo anti-CD40 antagonista. Además, CHIR-12.12 no induce una fuerte proliferación de los linfocitos humanos de sujetos normales. El anticuerpo es capaz de destruir las células diana que expresan CD40 mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). La afinidad de unión de CHIR-12.12 para el CD40 humano es 5×10^{-10} M, según se determina mediante el ensayo Biacore™.

50 En el presente documento se proporcionan las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las regiones variables del anticuerpo CHIR-12.12. Más concretamente, las secuencias de aminoácidos para las regiones líder, variable y constante de la cadena ligera y la cadena pesada para el mAb CHIR-12.12 se presentan en la SEQ ID Nº:2 (secuencia completa para la cadena ligera del mAb CHIR-12.12), SEQ ID Nº:4 (secuencia completa para la cadena pesada para el mAb CHIR-12.12) y SEC ID Nº:5 (secuencia completa para una variante de la cadena pesada para el mAb CHIR-12.12 presentada en la SEC ID Nº:4, en la que la variante comprende una sustitución del resto de alanina por serina en la posición 153 de la SEQ ID Nº:4). Las secuencias de nucleótidos que codifican la cadena ligera y la cadena pesada para el mAb CHIR-12.12 se presentan en la SEQ ID Nº:1 (secuencia codificante para la cadena ligera para el mAb CHIR-12.12) y SEC ID Nº:3 (secuencia codificante para la cadena pesada para el mAb CHIR-12.12). Los hibridomas que expresan el anticuerpo CHIR-12.12 se han depositado en la ATCC con la denominación de depósito de patente PTA- 5543.

65 Los anticuerpos anti-CD40 para su uso en los métodos de la presente invención incluyen anticuerpos que difieren del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 pero que conservan las CDR, y anticuerpos con una o más adiciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos. Los anticuerpos anti-CD40 para su uso en los métodos de la presente invención también pueden ser anticuerpos desinmunizados, particularmente anticuerpos anti-CD40

antagonistas desinmunizados, que pueden producirse como se describe, por ejemplo, en las publicaciones internacionales Nº WO 98/52976 y Nº WO 0034317. De esta manera, los restos dentro de los anticuerpos anti-CD40 antagonistas de la invención se modifican para hacer los anticuerpos no inmunogénicos o menos inmunogénicos para los seres humanos al tiempo que conservan su actividad antagonista hacia las células que expresan CD40 humano, en los que dicha actividad se mide mediante los ensayos indicados en otra parte del presente documento. También están incluidos dentro del alcance de la presente invención las proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo de interés, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40 antagonista o un anticuerpo anti-CD40L antagonista, o un fragmento del mismo, proteínas de fusión que pueden sintetizarse o expresarse a partir de los correspondientes vectores de polinucleótidos, como se conoce en la técnica. Tales proteínas de fusión se describen con respecto a la conjugación de anticuerpos como se ha indicado en otra parte del presente documento.

Cualquier anticuerpo conocido que tenga la especificidad de unión de interés puede tener variaciones de secuencia producidas utilizando los métodos descritos, por ejemplo, en las publicaciones de patente Nº EP 0983303 A1, WO 00/34317 y WO 98/52976. Por ejemplo, se ha demostrado que las secuencias dentro de la CDR pueden hacer que un anticuerpo se una al MHC de clase II y desencadene una respuesta no deseada de linfocitos T cooperadores. Una sustitución conservadora puede permitir que el anticuerpo conserve la actividad de unión y sin embargo pierda su capacidad para desencadenar una respuesta no deseada de linfocitos T. Puede realizarse cualquiera de tales sustituciones conservadoras o no conservadoras utilizando métodos conocidos en la técnica, tales como los indicados en otra parte del presente documento, y también pueden utilizarse los anticuerpos resultantes en los métodos de la presente invención. Los anticuerpos variantes pueden ensayarse de forma rutinaria para determinar la actividad concreta, por ejemplo, actividad antagonista, afinidad y especificidad utilizando los métodos descritos en el presente documento.

Por ejemplo, pueden prepararse variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo anti-CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12, mediante mutaciones en la secuencia de ADN clonado que codifica el anticuerpo de interés. Los métodos para la mutagénesis y las modificaciones de secuencias de nucleótidos son bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Walker y Gaastra, eds. (1983) Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, Nueva York); Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. EE.UU. 82:488-492; Kunkel *et al.* (1987) Methods Enzymol. 154:367-382; Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, Nueva York); la patente de EE.UU. Nº 4.873.192; y las referencias citadas en los mismos. Puede encontrarse orientación con respecto a las sustituciones apropiadas de aminoácidos que no influyen en la actividad biológica del polipéptido de interés en el modelo de Dayhoff *et al.* (1978) en Atlas of Protein Sequence and Structure (National Biomed. Res. Found., Washington, DC). Pueden resultar preferentes las sustituciones conservadoras, tales como el intercambio de un aminoácido con otro con propiedades similares. Los ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen, pero no se limitan a, Gly ⇌ Ala, Val ⇌ Ile ⇌ Leu, Asp ⇌ Glu, Lys ⇌ Arg, Asn ⇌ Gln, y Phe ⇌ Trp ⇌ Tyr.

En la construcción de variantes de un anticuerpo de interés, por ejemplo, un polipéptido anticuerpo anti-CD40 antagonista de interés, se realizan modificaciones de manera que las variantes sigan teniendo la actividad deseada, es decir, afinidad de unión similar y, en el caso de los anticuerpos anti-CD40 antagonistas, que sean capaces de unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expresado en la superficie de una célula humana, y estén libres de actividad agonista significativa pero presenten actividad antagonista cuando se unen a un antígeno CD40 en una célula que expresa CD40 humano. Obviamente, cualquier mutación realizada en el ADN que codifica el polipéptido variante no debe colocar la secuencia fuera del marco de lectura y preferentemente no creará regiones complementarias que pudieran producir una estructura secundaria de ARNm. Véase la publicación de solicitud de patente EP Nº 75.444.

Además, puede mutarse la región constante de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40 antagonista, para modificar la función efectora de diversas maneras. Por ejemplo, véase la patente de EE.UU. Nº 6.737.056B1 y la publicación de solicitud patente de EE.UU. Nº 2004/0132101A1, que describen mutaciones de Fc que optimizan la unión del anticuerpo a los receptores de Fc.

Preferentemente, las variantes de un anticuerpo de referencia, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40 antagonista, tienen secuencias de aminoácidos que tienen al menos un 70% o un 75% de identidad de secuencia, preferentemente al menos un 80% o un 85% de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 90%, un 91%, un 92%, un 93%, un 94% o un 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos para el anticuerpo de referencia, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 descrito en el presente documento, o a una porción más corta de la molécula de anticuerpo de referencia. Más preferentemente, las moléculas comparten al menos un 96%, un 97%, un 98% o un 99% de identidad de secuencia. Para los fines de la presente invención, el porcentaje de identidad de secuencia se determina utilizando el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman utilizando una búsqueda de huecos afines con una penalización por apertura de hueco de 12 y una penalización por extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se ilustra en Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489. Una variante puede diferir, por ejemplo, del anticuerpo de referencia, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40 antagonista, en tan solo 1 a 15 restos de aminoácidos, tan solo 1 a 10 restos de aminoácidos, tal como 6-10, tan solo 5, tan solo 4, 3, 2, o incluso 1 resto de aminoácido.

Con respecto a la alineación óptima de las dos secuencias de aminoácidos, el segmento contiguo de la secuencia de aminoácidos variante puede tener restos de aminoácidos adicionales o restos de aminoácidos suprimidos 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 restos de aminoácidos contiguos, y pueden ser 30, 40, 50 o más restos de aminoácidos. Puede realizarse correcciones para la identidad de secuencia asociada con los huecos o sustituciones de restos conservadores (véase el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman).

La estructura química exacta de un polipéptido capaz de unirse específicamente a CD40 y conservar la actividad antagonista, particularmente cuando se une al antígeno CD40 en las células diana, depende de varios factores. Como hay grupos amino y carboxilo ionizables presentes en la molécula, puede obtenerse un polipéptido concreto como una sal ácida o básica, o en forma neutra. Todas estas preparaciones que conservan su actividad biológica cuando se colocan en condiciones ambientales adecuadas se incluyen en la definición de anticuerpos anti-CD40 antagonistas tal como se utiliza en el presente documento. Además, puede aumentarse por derivatización la secuencia primaria de aminoácidos del polipéptido utilizando restos de azúcar (glycosilación) o mediante otras moléculas complementarias tales como lípidos, fosfato, grupos acetilo y similares. También puede aumentarse por conjugación con sacáridos. Determinados aspectos de tal aumento se logran a través de sistemas de procesamiento postraducionales del hospedador productor; pueden introducirse *in vitro* otras modificaciones semejantes. En cualquier caso, tales modificaciones se incluyen en la definición de anticuerpo anti-CD40 utilizada en el presente documento, siempre y cuando no se destruyan las propiedades antagonistas del anticuerpo anti-CD40. Se espera que tales modificaciones puedan influir en la actividad cuantitativa o cualitativamente, ya sea aumentando o disminuyendo la actividad del polipéptido, en los diversos ensayos. Además, los restos de aminoácidos individuales en la cadena pueden modificarse por oxidación, reducción u otra derivatización, y puede escindirse el polipéptido para obtener fragmentos que conserven la actividad. Tales modificaciones que no destruyen la actividad antagonista no eliminan la secuencia del polipéptido de la definición de anticuerpos anti-CD40 de interés tal como se utiliza en el presente documento.

La técnica proporciona orientación sustancial con respecto a la preparación y al uso de variantes del polipéptido. En la preparación de las variantes de anticuerpos anti-CD40, un experto en la materia puede determinar fácilmente qué modificaciones a la secuencia de nucleótidos o aminoácidos de la proteína nativa darán como resultado una variante adecuada para uso como componente terapéuticamente activo de una composición farmacéutica utilizada en los métodos de la presente invención.

El anticuerpo anti-CD40 para su uso en los métodos de la invención posee preferentemente al menos una de las siguientes actividades biológicas *in vitro* y/o *in vivo*: inhibición de la secreción de inmunoglobulinas por los linfocitos B periféricos humanos normales estimulada por linfocitos T; inhibición de la supervivencia y/o proliferación de linfocitos B periféricos humanos normales estimulada por células que expresan CD40L o por el ligando de CD40 soluble (sCD40L); inhibición de la supervivencia y/o proliferación de linfocitos B periféricos humanos normales estimulada por linfocitos T Jurkat; inhibición de las señales intracelulares antiapoptóticas de "supervivencia" en cualquier célula estimulada por sCD40L o CD40L en fase sólida; e inhibición de la transducción de señales de CD40 en cualquier célula tras la unión con sCD40L o CD40L en fase sólida, delección, anergia y/o inducción de la tolerancia de las células diana portadoras de CD40 o células portadoras de ligandos afines a CD40 incluidas, pero no limitadas a, linfocitos T y linfocitos B, inducción de la expansión o activación de los linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺ (véase, por ejemplo, el rechazo de tejidos específico de aloantígeno del donante por medio de la interferencia de CD40-CD40L, van Maurik *et al.* (2002) J. Immunol. 169:5401-5404), por medio de cualquier mecanismo de citotoxicidad (incluido, pero no limitado a, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), regulación negativa de la proliferación, y/o apoptosis en las células diana), modulación de la secreción de citocinas de las células diana y/o expresión de moléculas de superficie celular, y combinaciones de los mismos.

Pueden realizarse ensayos para las actividades biológicas como se describe en el presente documento y en las solicitudes provisionales tituladas "Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use", presentadas el 04 de noviembre 2003, el 26 de noviembre de 2003 y el 27 de abril de 2004, y las solicitudes de patente de EE.UU. cedidas Nº 60/517.337 (expediente del mandatario Nº PP20107.001 (035784/258442)), 60/525.579 (expediente del mandatario Nº PP20107.002 (035784/271525)), y 60/565.710 (expediente del mandatario Nº PP20107.003 (035784/277214)), respectivamente; y la solicitud de patente Internacional Nº PCT/US2004/037152 (expediente del mandatario Nº PP20107.004 (035784/282916)), publicada como WO 2005/044854, también titulada "Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use", presentada el 4 de noviembre de 2004. Véanse también los ensayos descritos en Schultze *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 92:8200-8204; Denton *et al.* (1998) Pediatr. Transplant. 2:6-15; Evans *et al.* (2000) J. Immunol. 164:688-697; Noelle (1998) Agents Actions Suppl. 49:17-22; Lederman *et al.* (1996) Curr. Opin. Hematol. 3:77-86; Coligan *et al.* (1991) Current Protocols in Immunology 13:12; Kwekkeboom *et al.* (1993) Immunology 79:439-444; y las patentes de EE.UU. Nº 5.674.492 y Nº 5.847.082.

Un ensayo representativo para detectar anticuerpos anti-CD40 antagonistas específicos para los epítopos del antígeno CD40 identificados en el presente documento es un "ensayo de unión competitiva". Los ensayos de unión

competitiva son ensayos serológicos en los que las incógnitas se detectan y se cuantifican por su capacidad para inhibir la unión de un ligando conocido marcado a su anticuerpo específico. Esto también se conoce como ensayo de inhibición competitiva. En un ensayo de unión competitiva representativo, el polipéptido CD40 marcado es precipitado por los anticuerpos candidatos en una muestra, por ejemplo, en combinación con anticuerpos monoclonales generados contra uno o más epítopos de los anticuerpos monoclonales de la invención. Los anticuerpos anti-CD40 que reaccionan específicamente con un epítopo de interés pueden identificarse cribando varios anticuerpos preparados contra una proteína CD40 o fragmento de la proteína que comprende el epítopo concreto de la proteína CD40 de interés. Por ejemplo, para el CD40 humano, los epítopos de interés incluyen epítopos que comprenden restos de aminoácidos lineales y/o no lineales de la isoforma corta del CD40 humano (véase el Nº de registro del GenBank NP_690593) presentada en la SEQ ID Nº:10, codificada por la secuencia presentada en la SEQ ID Nº:9 (véase también el Nº de registro del GenBank NM_152854), o de la isoforma larga del CD40 humano (véanse los números de registro del GenBank CAA43045 y NP_001241), presentada en la SEC ID Nº:12, codificada por la secuencia presentada en la SEC ID Nº:11 (véase los números de registro del GenBank X60592 y NM_001250). Como alternativa, podrían utilizarse ensayos de unión competitiva con anticuerpos anti-CD40 antagonistas adecuados identificados con anterioridad para seleccionar anticuerpos monoclonales comparables a los anticuerpos identificados con anterioridad.

Los anticuerpos empleados en tales inmunoensayos pueden estar marcados o no marcados. Pueden emplearse anticuerpos no marcados en la aglutinación; pueden emplearse anticuerpos marcados en una amplia variedad de ensayos, empleando una amplia variedad de marcadores. Puede facilitarse la detección de la formación de un complejo antígeno-anticuerpo entre un anticuerpo anti-CD40 y un epítopo de interés fijando una sustancia detectable al anticuerpo. Los medios de detección adecuados incluyen el uso de marcadores tales como radionúclidos, enzimas, coenzimas, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, cromógenos, cofactores o sustratos enzimáticos, inhibidores de enzimas, complejos de grupos prostéticos, radicales libres, partículas, colorantes y similares. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de 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 adecuados incluyen umbeliferon, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente es el luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y los ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^{3}H . Tales reactivos marcados pueden utilizarse en diversos ensayos bien conocidos, tales como radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos, por ejemplo, ELISA, inmunoensayos de fluorescencia, y similares. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 3.766.162, 3.791.932, 3.817.837 y 4.233.402.

También es posible modificar por ingeniería genética un anticuerpo para que tenga una actividad ADCC aumentada. En concreto, la mitad carboxilo terminal del dominio CH₂ es fundamental para la ADCC mediada a través del receptor Fc γ RIII. Dado que las regiones CH₂ y bisagra tienen un papel importante en las funciones efectoras, pueden crearse varios anticuerpos de dominio múltiple que contengan regiones bisagra y/o CH₂ adicionales e investigar cualquier cambio de la potencia efectora (véase Greenwood, J., Gorman, SD, Routledge, EG, Lloyd, I.S. & Waldmann, H., *Ther Immunol.* 1994 Oct.; 1(5):247-55). Un enfoque alternativo puede ser obtener por ingeniería genética dominios adicionales en paralelo, por ejemplo, a través de la creación de dímeros mediante ingeniería genética de una cisteína en la cadena H de una Ig híbrida (véase Shope B. (1992) *J. Immunol.* 1992 1; 148(9):2918-22). Además, pueden obtenerse por ingeniería genética cambios para aumentar la actividad ADCC mediante la introducción de mutaciones en la región Fc (véase, por ejemplo, el documento EE.UU. 6.737.056 B1), la expresión de células en líneas celulares deficientes para fucosiltransferasa (véase, por ejemplo, el documento EE.UU. 03/0115614), o efectuando otros cambios en la glicosilación de anticuerpos (véase, por ejemplo, el documento EE.UU. 6.602.684).

La presente invención resulta especialmente ventajosa para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias asociadas con células que expresan CD20, en concreto en pacientes resistentes a Rituxan®, más concretamente en los que son homocigóticos o heterocigóticos para Fc γ RIIIa-158F (genotipo F/F o V/F).

Tal como se utiliza en el presente documento, "anticuerpo anti-CD20" abarca cualquier anticuerpo que reconoce específicamente el antígeno de superficie celular CD20, incluidos anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos monocatenarios, y fragmentos de los mismos tales como Fab, F(ab')₂, Fv, y otros fragmentos que conservan la función de unión al antígeno del anticuerpo anti-CD20 parental. Resultan de especial interés en relación con los métodos de la presente invención los anticuerpos anti-CD20 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que tienen las propiedades de unión que presenta el anticuerpo monoclonal IDEC-C2B8 (Biogen Idec Inc., Cambridge, MA).

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-CD40 utilizados en los métodos de la invención presentan una actividad terapéutica más potente que el anticuerpo monoclonal anti-CD20 híbrido IDEC-C2B8, en el que la actividad terapéutica se ensaya con cantidades equivalentes de estos anticuerpos en un modelo experimental apropiado. IDEC-C2B8 (IDEC Pharmaceuticals Corp., San Diego, California; disponible en el mercado con el nombre comercial Rituxan®, también conocido como rituximab) es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 híbrido que contiene

IgG1 humana y regiones constantes kappa con regiones variables murinas aisladas a partir de un anticuerpo monoclonal anti-CD20 murino, IDEC-2B8 (Reff *et al.* (1994) Blood 83:435-445). Rituximab está autorizado para el tratamiento del linfoma no hodgkiniano folicular (LNH) o de bajo grado de malignidad de linfocitos B recidivante, y se encuentra en ensayos clínicos para las enfermedades autoinmunitarias. El descubrimiento de anticuerpos con actividad terapéutica superior en comparación con rituximab podría mejorar radicalmente los métodos del tratamiento para las enfermedades inflamatorias y las enfermedades autoinmunitarias.

Existen modelos adecuados para ensayar la actividad en el lupus eritematoso sistémico (LES), la esclerosis múltiple, la aterosclerosis y la inflamación, el trasplante y la enfermedad de Alzheimer, como se describe más adelante.

Por ejemplo, para ensayar la eficacia en el lupus eritematoso sistémico (LES) humano, en el que las células mononucleares de sangre periférica (PMBC) de pacientes con LES se implantan en ratones SCID. Véase, por ejemplo, el modelo descrito en Duchosal *et al.* J. Exp. Med. 172:985-8. Después transferir las PBMC de pacientes con LES en ratones SCID, se determina si el tratamiento influye o no en la respuesta de los linfocitos T para la producción de autoantígenos y autoanticuerpos y las manifestaciones de la enfermedad, tales como la glomerulonefritis.

La encefalitis autoinmunitaria experimental (EAE) en monos tití es un modelo para la esclerosis múltiple humana. Véase, por ejemplo, el modelo descrito en Raine *et al.* (1999) Ann. Neurol. 46:144-60 y Hart *et al.* (2004) Lancet Neurol. 3:588-97.

Pueden ensayarse los anticuerpos *in vitro* para determinar su capacidad para inhibir la producción inducida por CD40L de las enzimas que degradan la matriz, la expresión de factor tisular, las citocinas proinflamatorias y la regulación positiva de moléculas de adhesión. Los estudios posteriores ensayan la capacidad de los anticuerpos para mostrar actividades antiinflamatorias *in vivo* utilizando ratones transgénicos que expresan el CD40 humano y/o moléculas CD20. Véase, por ejemplo, el modelo descrito en Yasui (2002) Int. Immunol. 14:319-29.

Pueden ensayarse los anticuerpos para determinar su capacidad para prevenir el rechazo de trasplante en modelos de primates no humanos. Se trata a receptores de aloinjerto renal de mono *Cynomolgus* con anticuerpos para demostrar el efecto sobre la aceptación del injerto con o sin fármacos inmunosupresores adicionales tales como ciclosporina, FK506, rapamicina, corticosteroides, CTLA4-Ig y anticuerpo anti-estimulador de linfocitos B, y similares. Véase, por ejemplo, el modelo descrito en Wee *et al.* (1992) Transplantation 53:501-7.

Para la enfermedad de Alzheimer, pueden ensayarse primero los anticuerpos *in vitro* para determinar su capacidad para bloquear la activación microglial. Pueden llevarse a cabo estudios de eficacia *in vivo* con los anticuerpos en ratones doble transgénicos que expresan CD20 y/o CD40 humano y que sobreproducen péptido beta-amiloide. Véase, por ejemplo, el modelo descrito en Tan *et al.* (2002) Nat. Neurosci. 5:1288-93.

“Cantidad equivalente” del anticuerpo anti-CD40 de la invención y Rituxan® se refiere a que se administra la misma dosis o una dosis menor en mg en base al peso. Por lo tanto, cuando el anticuerpo anti-CD40 se dosifica a 0,01 mg/kg de peso corporal del ratón utilizado en el modelo, el Rituxan® también se dosifica a 0,01 mg/kg de peso corporal del ratón. De forma similar, cuando el anticuerpo anti-CD40 se dosifica a 0,1 mg/kg, 1 mg/kg ó 10 mg/kg de peso corporal del ratón utilizado en el modelo, el Rituxan® también se dosifica a 0,1 mg/kg, 1 mg/kg ó 10 mg/kg, respectivamente, del peso corporal del ratón.

Otra diferencia de la eficacia del anticuerpo es medir *in vitro* la concentración de anticuerpo necesaria para obtener la máxima lisis de las células diana *in vitro* en presencia de linfocitos NK. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD40 de la invención alcanzan la lisis máxima de las células Daudi a una CE50 inferior a ½, y preferentemente ¼, y lo más preferentemente, 1/10 la concentración de Rituxan®. Este tipo de medición también se describe en los Ejemplos del presente documento.

Los anticuerpos anti-CD40 que se benefician de tener una eficacia significativamente superior a la de las cantidades equivalentes de Rituxan® en los ensayos descritos anteriormente pueden incluir:

- 55 a) el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12;
- b) el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 12.12;
- c) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia mostrada en la SEC ID N°:2, la secuencia mostrada en la SEC ID N°:4, la secuencia mostrada en la SEQ ID N°:5, las secuencias mostradas en la SEQ ID N°:2 y en la SEQ ID N°:4, y las secuencias mostradas en la SEQ ID N°:2 y en la SEQ ID N°:5;
- 60 d) un anticuerpo monoclonal con una secuencia de aminoácidos codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia mostrada en la SEC ID N°:1, la secuencia mostrada en la SEQ ID N°:3, y las secuencias mostradas en la SEQ ID N°:1 y en la SEQ ID N°:3;

- e) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 12.12;
- f) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo que comprende los restos 82-87 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID N°:7 o la SEQ ID N°:9;
- 5 g) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo que comprende los restos 82-89 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID N°:7 o la SEQ ID N°:9;
- h) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitiva;
- 10 i) el anticuerpo monoclonal del punto anterior a) o un anticuerpo monoclonal de cualquiera de los puntos anteriores c)-h), en el que dicho anticuerpo se produce por recombinación; y
- j) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal de cualquiera de los puntos anteriores a)-i), en el que dicho fragmento conserva la capacidad de unirse específicamente a dicho antígeno CD40 humano.
- 15 En el presente documento se describe un método para identificar a un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria que puede tratarse con un anticuerpo anti-CD40, que comprende:
- a) identificar a un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40; y
- 20 b) determinar el genotipo de FcyRIIIa-158 de dicho paciente humano (V/V, V/F o F/F);
- en el que dicha enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria puede tratarse con un anticuerpo anti-CD40 si dicho paciente humano es homocigótico o heterocigótico para FcyRIIIa-158F (genotipo F/F o V/F). La enfermedad inflamatoria o la enfermedad autoinmunitaria puede ser resistente al tratamiento con rituximab (Rituxan®).
- 25 Una vez se ha identificado un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria que puede tratarse con un anticuerpo anti-CD40, puede tratarse a continuación a ese paciente humano con un anticuerpo anti-CD40. Por lo tanto, el método puede incluir la etapa adicional de (c) administrar a un paciente humano identificado como homocigótico o heterocigótico para FcyRIIIa-158F (genotipo F/F o V/F) una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40.
- 30 Un experto en la materia puede llevar a cabo fácilmente este método de identificación de un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria que puede tratarse con un anticuerpo anti-CD40 utilizando un kit de diagnóstico adecuado. El kit debe comprender reactivos adecuados para determinar el genotipo de FcyRIIIa-158 de un paciente humano. En el presente documento también se describe un kit para identificar a un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria que puede tratarse con un anticuerpo anti-CD40, que comprende reactivos para determinar el genotipo de FcyRIIIa-158 de un paciente humano. Los kits adecuados se describen con más detalle en otra parte del presente documento.
- 35 40 En el presente documento también se describe un método para seleccionar un tratamiento con anticuerpos para tratar a un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria, que comprende:
- a) identificar a un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40; y
- 45 b) determinar el genotipo de FcyRIIIa-158 de dicho paciente humano (V/V, V/F o F/F),
- en el que, si dicho paciente humano es homocigótico o heterocigótico para FcyRIIIa-158F (genotipo F/F o V/F), se selecciona un anticuerpo anti-CD40 para tratar dicha enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria. La enfermedad inflamatoria o la enfermedad autoinmunitaria puede ser resistente al tratamiento con rituximab (Rituxan®).
- 50 55 Una vez se ha seleccionado un tratamiento con anticuerpos anti-CD40 para tratar a un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria, puede tratarse a continuación a ese paciente humano con un anticuerpo anti-CD40. Por lo tanto, el método puede incluir la etapa adicional de (c) administrar a un paciente humano identificado como homocigótico o heterocigótico para FcyRIIIa-158F (genotipo F/F o V/F) una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40.
- 60 65 Un experto en la materia también puede llevar a cabo fácilmente este método de selección de un tratamiento con anticuerpos para tratar a un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria utilizando un kit de diagnóstico adecuado. El kit debe comprender reactivos adecuados para determinar el genotipo de FcyRIIIa-158 de un paciente humano. En el presente documento también se describe un kit para seleccionar un tratamiento con anticuerpos para tratar a un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40, que comprende reactivos para determinar el genotipo de FcyRIIIa-158 de un paciente humano.

“Que puede tratarse con un anticuerpo anti-CD40” se refiere a que cuando se trata al paciente humano (es decir, un individuo con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria) con el anticuerpo anti-CD40, se beneficiará de una “respuesta terapéutica positiva” (tal como se define en otra parte del presente documento) con respecto a la enfermedad inflamatoria o a la enfermedad autoinmunitaria para la cual se busca el tratamiento.

- 5 Se contempla cualquier método para determinar el genotipo de Fc_yRIIIa-158 de un paciente humano utilizando una muestra biológica obtenida del paciente humano.
- 10 Por ejemplo, en el presente documento se describe un kit para su uso en la determinación del genotipo de Fc_yRIIIa-158 de un paciente humano, que incluye una micromatriz que comprende al menos una sonda de 10 o más nucleótidos de longitud y una secuencia adecuada para determinar el genotipo de Fc_yRIIIa-158 de un paciente humano. Se hibrida ARN o ADN marcado con sondas complementarias en la matriz y a continuación se detectan mediante exploración láser. Se determinan las intensidades de hibridación para cada sonda en la matriz y se convierten en un valor cuantitativo que representa los niveles relativos de expresión génica. El experto puede realizar fácilmente la selección de las longitudes y secuencias de la sonda. Se conoce la secuencia de nucleótidos del ARNm y del gen humano que codifica los alotipos F y V de Fc_yRIIIa-158. Por lo tanto, el experto puede seleccionar la(s) sonda(s) que, en las condiciones experimentales apropiadas, permita(n) determinar el genotipo de Fc_yRIIIa-158 de las secuencias diana.
- 15 20 Las técnicas para la síntesis de estas matrices utilizando métodos de síntesis mecánicos se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. Nº 5.384.261. Aunque resulta preferente una superficie de matriz plana, puede fabricarse la matriz en una superficie de prácticamente cualquier forma o incluso una multiplicidad de superficies. Las matrices pueden ser péptidos o ácidos nucleicos en perlas, geles, superficies poliméricas, fibras tales como fibra óptica, vidrio o cualquier otro sustrato apropiado, véanse las patentes de EE.UU. Nº 5.770.358, 5.789.162, 5.708.153, 6.040.193 y 5.800.992. Las matrices pueden envasarse de tal manera que permitan el diagnóstico u otra manipulación de un dispositivo con todo incluido. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 5.856.174 y Nº 5.922.591.
- 25 30 Por ejemplo, en el presente documento también se describe un kit para su uso en la determinación del genotipo de Fc_yRIIIa-158 de un paciente humano, que comprende los oligonucleótidos adecuados para su uso como cebadores en la amplificación catalizada por la polimerasa de la región del gen o del ARNm que codifica el aminoácido 158 de Fc_yRIIIa. El experto en la materia puede realizar fácilmente la selección de las longitudes y las secuencias de los cebadores. Se conoce la secuencia de nucleótidos del ARNm y del gen humano que codifica los alotipos F y V de Fc_yRIIIa-158. Por lo tanto, el experto en la materia puede seleccionar los cebadores que, en las 35 condiciones experimentales adecuadas, permitan la amplificación de la región del gen o del ARNm que codifica el aminoácido 158 de Fc_yRIIIa. A continuación, puede secuenciarse la secuencia amplificada utilizando métodos conocidos para determinar el genotipo de Fc_yRIIIa-158 del paciente.
- 40 45 Otro método para determinar el genotipo de Fc_yRIIIa-158 de un paciente humano es utilizar un método basado en ácidos nucleicos que detecta la fragmentación de ADN que es característica del genotipo de Fc_yRIIIa-158 del paciente humano. Cuando se resuelve mediante electroforesis en geles de agarosa, el ADN de cada genotipo de Fc_yRIIIa-158 tiene un patrón característico. En el presente documento también se describe un kit para su uso en la determinación del genotipo de Fc_yRIIIa-158 de un paciente humano, que comprende una o más enzimas de restricción adecuadas para determinar el genotipo de Fc_yRIIIa-158 de un paciente humano. Las enzimas de restricción adecuadas son conocidas en la técnica (por ejemplo, véase Koene *et al.*, Blood, 1997, Vol. 90, Nº 3, p. 1109-1114).
- 50 55 Los kits descritos en el presente documento también pueden incluir instrucciones que indican cómo utilizar el kit para determinar el genotipo de Fc_yRIIIa-158 de un paciente humano. El kit también puede comprender, por ejemplo, un agente tampón, un conservante o un agente estabilizador de proteínas. Cada componente del kit está normalmente dentro de un recipiente individual, y los diversos recipientes se encuentran dentro de un solo paquete junto con las instrucciones que indican cómo utilizar el kit para determinar el genotipo de Fc_yRIIIa-158 de un paciente humano.
- 60 65 La invención proporciona el uso de anticuerpos anti-CD40 en la fabricación de medicamentos para tratar una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40, como se describe en otra parte del presente documento.
- 65 Los anticuerpos anti-CD40 de la presente invención se administran a una concentración que es terapéuticamente eficaz para prevenir o tratar una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40. Para lograr este objetivo, los anticuerpos pueden formularse utilizando diversos excipientes y/o vehículos aceptables conocidos en la técnica. El anticuerpo anti-CD40 puede administrarse por una vía de administración parenteral. Por lo general, los anticuerpos se administran por inyección, ya sea por vía intravenosa o por vía subcutánea. Los expertos habituales en la técnica conocen los métodos para lograr esta administración.

La administración intravenosa se produce preferentemente por infusión durante un período de aproximadamente media hora a 1 hora, a aproximadamente 10 horas (menos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 horas). Las infusiones posteriores pueden administrarse durante un período aproximadamente inferior a 1 a 5 aproximadamente 6 horas, incluidas, por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 4 horas, aproximadamente 1 a aproximadamente 3 horas, o aproximadamente 1 a aproximadamente 2 horas o menos de una hora. Como alternativa, puede administrarse un anticuerpo anti-CD40 tal como CHIR-12.12 por vía subcutánea.

Se formula una composición farmacéutica de la invención para que sea compatible con su vía de administración prevista. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral pueden incluir los 10 siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, 15 tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede meterse en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis hechos de vidrio o plástico.

Los anticuerpos anti-CD40 se proporcionan por lo general mediante una técnica convencional dentro de un 20 tampón farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, solución salina estéril, agua tamponada estéril, combinaciones de los anteriores, etc. Los métodos para preparar agentes que pueden administrarse por vía parenteral se describen en Pharmaceutical Sciences de Remington (18^a ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990). Véase también, por ejemplo, el documento WO 98/56418, que describe formulaciones farmacéuticas de anticuerpos estabilizadas adecuadas para su uso en los métodos de la presente invención.

Un experto habitual en la técnica determina fácilmente sin excesiva experimentación la cantidad de al menos 25 un anticuerpo anti-CD40 a administrar. Los factores que influyen en el modo de administración y en la respectiva cantidad de al menos un anticuerpo anti-CD40 incluyen, pero no se limitan a, la gravedad de la enfermedad, la evolución de la enfermedad, y la edad, la altura, el peso, la salud y el estado físico del individuo sometido al tratamiento. De forma similar, la cantidad de anticuerpo anti-CD40 a administrar dependerá del modo de administración y de si el sujeto se someterá a una dosis única o a dosis múltiples de este agente antitumoral. En 30 general, resulta preferente una dosis más alta del anticuerpo anti-CD40 a medida que aumenta el peso del sujeto sometido al tratamiento.

La dosis de anticuerpo anti-CD40 a administrar se encuentra en el intervalo comprendido entre 35 aproximadamente 0,003 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg, entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 40 mg/kg, entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg, entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg, entre aproximadamente 0,5 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg, entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg, entre aproximadamente 3 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg, entre aproximadamente 3 mg/kg y aproximadamente 25 mg/kg, entre aproximadamente 3 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg, entre aproximadamente 5 mg/kg y aproximadamente 15 mg/kg, o entre 40 aproximadamente 7 mg/kg y aproximadamente 12 mg/kg.

Por lo tanto, por ejemplo, la dosis puede ser de 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg o 45 50 mg/kg, u otras dosis semejantes incluidas en el intervalo comprendido entre aproximadamente 0,3 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg.

El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo puede incluir un único 50 tratamiento o, preferentemente, puede incluir varios tratamientos. Por lo tanto, en otra forma de realización de la invención, el método comprende la administración de dosis múltiples de anticuerpo anti-CD40. El método 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 55 eficaces de una composición farmacéutica que comprende un anti-CD40. Un experto en la materia puede determinar fácilmente sin excesiva experimentación la frecuencia y la duración de la administración de dosis múltiples de las composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo anti-CD40. Puede administrarse la misma dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40 a lo largo de un período de tratamiento. Como alternativa, pueden utilizarse diferentes dosis terapéuticamente eficaces de un anticuerpo anti-CD40 a lo largo de un período de tratamiento.

En un ejemplo preferente, se trata a un sujeto con el anticuerpo anti-CD40 en el intervalo de entre 60 aproximadamente 0,1 mg/kg y 20 mg/kg de peso corporal, una vez por semana durante entre aproximadamente 1 y 10 semanas, preferentemente entre aproximadamente 2 y 8 semanas, más preferentemente entre aproximadamente 3 y 7 semanas, e incluso más preferentemente durante aproximadamente 4, 5 ó 6 semanas. El tratamiento puede darse semestralmente o anualmente para prevenir una recaída o si hay indicios de recaída. También se entenderá que la dosis eficaz del anticuerpo utilizado para el tratamiento puede aumentar o disminuir a lo largo de un tratamiento concreto. Los cambios en la dosis pueden resultar evidentes y ponerse de manifiesto a partir de los resultados de los ensayos de diagnóstico, como se describe en el presente documento.

Por lo tanto, 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 los días 1, 8, 15 y 22 de un período de tratamiento. En otra forma de realización, el régimen de dosificación incluye un régimen de dosificación con una primera administración de una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti-CD40 al día, o los días 5 1, 3, 5, y 7 de una semana en un período de tratamiento; un régimen de dosificación que incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti-CD40 los días 1 y 3-4 de una 10 semana en un período de tratamiento; y un régimen de dosificación preferente que incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti-CD40 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, 2 meses, 3 meses, 6 meses o un año. Los períodos de tratamiento pueden ser posteriores o estar separados entre sí una semana, 2 semanas, un mes, 3 meses, 6 meses o un año.

En otras formas de realización, la dosis terapéuticamente eficaz inicial de un anticuerpo anti-CD40 como se define en otra parte del presente documento puede estar en el intervalo de dosificación inferior (es decir, de aproximadamente 0,003 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg) estando incluidas las dosis posteriores en el intervalo 15 de dosificación superior (es decir, de aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg).

En formas de realización alternativas, la dosis terapéuticamente eficaz inicial de un anticuerpo anti-CD40 como se define en otra parte del presente documento puede estar en el intervalo de dosificación superior (es decir, de 20 aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg) estando incluidas las dosis posteriores en el intervalo de dosificación inferior (es decir, de 0,003 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg). Por lo tanto, en algunas formas de realización de la invención, el tratamiento con el anticuerpo anti-CD40 puede iniciarse administrando al sujeto que necesita el tratamiento una "dosis de carga" del anticuerpo. "Dosis de carga" se refiere a una dosis inicial del 25 anticuerpo anti-CD40 que se administra al sujeto, en el que la dosis del anticuerpo administrado está incluida en el intervalo de dosificación superior (es decir, de aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg). La "dosis de carga" puede administrarse como una única administración, por ejemplo, una única infusión en la que el anticuerpo se administra por vía intravenosa, o como administraciones múltiples, por ejemplo, infusiones múltiples en 30 las que el anticuerpo se administra por vía intravenosa, siempre que la "dosis de carga" completa se administre en un período de aproximadamente 24 horas. Después de la administración de la "dosis de carga", a continuación se administra al sujeto una o más dosis terapéuticamente eficaces adicionales del anticuerpo anti-CD40. Las dosis posteriores terapéuticamente eficaces pueden administrarse, por ejemplo, según un programa semanal de dosificación, o una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas. En tales 35 formas de realización, las dosis posteriores terapéuticamente eficaces generalmente están incluidas en el intervalo de dosificación inferior (es decir, de 0,003 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg).

Como alternativa, en algunas formas de realización, tras la "dosis de carga", las dosis posteriores terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti-CD40 se administran según un "programa de mantenimiento", en el 40 que la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo 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, las dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti-CD40 están incluidas en el intervalo de dosificación inferior (es decir, de 0,003 mg/kg a 45 aproximadamente 20 mg/kg), especialmente cuando las dosis posteriores se administran a intervalos más frecuentes, por ejemplo, entre una vez cada dos semanas y una al mes, o dentro del intervalo de dosificación superior (es decir, de aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg), especialmente cuando las dosis posteriores se administran a intervalos menos frecuentes, por ejemplo, cuando las dosis posteriores se administran con una diferencia de entre aproximadamente un mes y aproximadamente 12 meses.

50 Los anticuerpos anti-CD40 presentes en las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento para su uso en los métodos de la invención pueden ser nativos u obtenerse mediante 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. Preferentemente, tales polipéptidos se derivan de una fuente humana, y más preferentemente son proteínas humanas recombinantes de líneas celulares de hibridoma.

55 Las composiciones farmacéuticas útiles en los métodos de la invención pueden comprender variantes biológicamente activas de los anticuerpos anti-CD40 antagonistas de la invención, como se describe en otra parte del presente documento.

60 En los métodos de la invención puede utilizarse cualquier composición farmacéutica que comprenda un anticuerpo anti-CD40 con las propiedades de unión que se describen en el presente documento como componente terapéuticamente activo. Por lo tanto pueden prepararse composiciones líquidas, liofilizadas o secadas por aspersión que comprendan uno o más de los anticuerpos anti-CD40 como una suspensión o solución acuosa o no acuosa para su posterior administración a un sujeto según los métodos de la invención. Cada una de estas composiciones comprenderá al menos un anticuerpo anti-CD40 como componente terapéuticamente o profilácticamente activo. "Componente terapéuticamente o profilácticamente activo" se refiere a que el anticuerpo anti-CD40 está

específicamente incorporado en la composición para provocar una respuesta terapéutica o profiláctica deseada con respecto al tratamiento, la prevención o el diagnóstico de una enfermedad o afección en un sujeto cuando la composición farmacéutica se administra a ese sujeto. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas comprenden agentes estabilizadores, agentes de carga, o ambos, apropiados para reducir al mínimo los problemas asociados con la pérdida de estabilidad de las proteínas y la actividad biológica durante la preparación y el almacenamiento.

Pueden añadirse formulantes a las composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-CD40 de la invención. Estos formulantes pueden incluir, pero no se limitan a, aceites, polímeros, vitaminas, hidratos de carbono, aminoácidos, sales, tampones, albúmina, tensioactivos o agentes de carga. Preferentemente los carbohidratos incluyen azúcar o alcoholes de azúcares 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, α y β ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietilalmidón y carboximetilcelulosa, o mezclas de los mismos. El "alcohol de azúcar" se define como un hidrocarburo C₄ a C₈ que tiene un grupo hidroxilo e incluye galactitol, inositol, manitol, xilitol, sorbitol, glicerol y arabitol. Estos azúcares o alcoholes de azúcares pueden utilizarse individualmente o en combinación. La concentración de azúcar o alcohol de azúcar se encuentra entre aproximadamente un 1,0% y un 7% p/v, más preferentemente entre un 2,0% y un 6,0% p/v. Preferentemente, los aminoácidos incluyen las formas levógiros (L) de la carnitina, la arginina y la betaina; sin embargo, pueden añadirse otros aminoácidos. Los polímeros preferentes incluyen polivinilpirrolidona (PVP) con un peso molecular medio entre 2.000 y 3.000, o polietilenglicol (PEG) con un peso molecular medio entre 3.000 y 5.000. Los tensioactivos que pueden añadirse a la formulación se muestran en los documentos EP Nº 270.799 y 268.110.

Además, los anticuerpos pueden modificarse químicamente por conjugación covalente a un polímero para aumentar su semivida en circulación, por ejemplo. Los polímeros preferentes, y los métodos para fijarlos a péptidos, se muestran en las patentes de EE.UU. Nº 4.766.106, 4.179.337, 4.495.285 y 4.609.546. Los polímeros preferentes son polioles polioxetilados y polietilenglicol (PEG). El PEG es soluble en agua a temperatura ambiente y tiene la fórmula general: R(O-CH₂-CH₂)_nO-R en la que R puede ser hidrógeno, o un grupo protector tal como un grupo alquilo o alcanol. Preferentemente, el grupo protector tiene entre 1 y 8 átomos de carbono, más preferentemente es metilo. El símbolo n es un número entero positivo, preferentemente entre 1 y 1.000, más preferentemente entre 2 y 500. El PEG tiene un peso molecular medio preferente entre 1.000 y 40.000, más preferentemente entre 2.000 y 20.000, lo más preferentemente entre 3.000 y 12.000. Preferentemente, el PEG tiene al menos un grupo hidroxi, más preferentemente es un grupo hidroxi terminal. Es este grupo hidroxi el que se activa preferentemente para reaccionar con un grupo amino libre en el inhibidor. Sin embargo, se entenderá que puede variarse el tipo y la cantidad de grupos reactivos para lograr un PEG/anticuerpo conjugado covalentemente de la presente invención.

Los polioles polioxetilados solubles en agua también resultan útiles en la presente invención. Incluyen sorbitol polioxetilado, glucosa polioxetilada, glicerol polioxetilado (POG), y similares. Resulta preferente el POG. Una razón es que el esqueleto de glicerol del glicerol polioxetilado es el mismo esqueleto que se producen de forma natural, por ejemplo, en animales y seres humanos en los mono-, di-, triglicéridos. Por lo tanto, estas ramificaciones no serían vistas necesariamente como un agente extraño en el cuerpo. El POG tiene un peso molecular preferente en el mismo intervalo que el PEG. La estructura para el POG se muestra en Knauf *et al.* (1988) J. Bio. Chem. 263:15064-15070, y se encuentra un análisis de los conjugados POG/IL-2 en la patente de EE.UU. Nº 4.766.106.

Otro sistema de administración de fármacos para aumentar la semivida en circulación es el liposoma. Los métodos para preparar sistemas de administración de liposomas se analizan en Gabizon *et al.* (1982) Cancer Research 42:4734; Cafiso (1981) Biochem Biophys Acta 649:129; y Szoka (1980) Ann. Rev. Biophys. Eng. 9:467. Otros sistemas de administración de fármacos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Poznansky *et al.* (1980) Drug Delivery Systems (R.L. Juliano, ed., Oxford, N.Y.) págs. 253-315; Posnansky (1984) Pharm Revs 36:277.

Los formulantes a incorporar a una composición farmacéutica deben proporcionar estabilidad al anticuerpo anti-CD40. Esto es, el anticuerpo anti-CD40 debe conservar su estabilidad física y/o química y tener la actividad biológica deseada, es decir, una o más de las actividades antagonistas definidas anteriormente en el presente documento, incluidas, pero no limitadas a, inhibición de la secreción de inmunoglobulinas por los linfocitos B periféricos humanos normales estimulada por linfocitos T; inhibición de la supervivencia y/o proliferación de los linfocitos B periféricos humanos normales estimulada por linfocitos T Jurkat; inhibición de la supervivencia y/o proliferación de los linfocitos B periféricos humanos normales estimulada por células que expresan CD40L o el ligando CD40 soluble (sCD40L); inhibición de las señales intracelulares antiapoptóticas de "supervivencia" en cualquier célula estimulada por sCD40L o CD40L en fase sólida; inhibición de la transducción de señales de CD40 en cualquier célula tras la ligación con sCD40L o CD40L en fase sólida; e inhibición de la proliferación de los linfocitos B malignos humanos como se ha indicado en otra parte del presente documento.

Los métodos para monitorizar la estabilidad de las proteínas son bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Jones (1993) Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90; Lee, ed. (1991) Peptide and Protein Drug Delivery (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Nueva York) y los ensayos de estabilidad que se describen más adelante en el presente documento. En general, la estabilidad de las proteínas se mide a una temperatura elegida durante un determinado

período de tiempo. En las formas de realización preferentes, una formulación farmacéutica de anticuerpos estable garantiza la estabilidad del anticuerpo anti-CD40 cuando se almacena a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) durante al menos 1 mes, al menos 3 meses o al menos 6 meses, y/o es estable a aproximadamente 2°C-8°C durante al menos 6 meses, al menos 9 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses.

5 Se considera que una proteína tal como un anticuerpo, cuando está formulada en una composición farmacéutica, conserva su estabilidad física en un momento determinado si no muestra signos visuales (es decir, decoloración o pérdida de claridad) o signos mensurables (por ejemplo, utilizando la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) o la dispersión de luz UV) de precipitación, agregación, y/o desnaturización en esa composición farmacéutica. Con respecto a la estabilidad química, se considera que una proteína tal como un anticuerpo, cuando está formulada en una composición farmacéutica, conserva su estabilidad química en un momento determinado si las mediciones de estabilidad química indican que la proteína (es decir, el anticuerpo) conserva la actividad biológica de interés en esa composición farmacéutica. Los métodos para monitorizar los cambios en la estabilidad química son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, métodos para detectar las formas químicamente modificadas de la proteína como resultado del acortamiento, utilizando, por ejemplo, SDS-PAGE, SEC, y/o espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización por láser asistida por matriz; y la degradación asociada con cambios en la carga molecular (por ejemplo, asociada con la desamidación), utilizando, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico. Véanse, por ejemplo, los métodos que se describen más adelante en el presente documento.

10 20 Se considera que un anticuerpo anti-CD40, cuando está formulado en una composición farmacéutica, conserva una actividad biológica deseada en un momento determinado si la actividad biológica deseada en ese momento está dentro de aproximadamente un 30%, preferentemente dentro de aproximadamente un 20% de la actividad biológica deseada presentada en el momento en el 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 pueden realizarse como se describe en los Ejemplos del presente documento. Véanse también los ensayos descritos en Schultze *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 92:8200-8204; Denton *et al.* (1998) Pediatr. Transplant. 2:6-15; Evans *et al.* (2000) J. Immunol. 164:688-697; Noelle (1998) Agents Actions Suppl. 49:17-22; Lederman *et al.* (1996) Curr. Opin. Hematol. 3:77-86; Coligan *et al.* (1991) Current Protocols in Immunology 13:12; Kwekkeboom *et al.* (1993) Immunology 79:439-444; y las patentes de EE.UU. Nº 5.674.492 y 5.847.082.

15 30 35 En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40 está formulado en una formulación farmacéutica líquida. Puede prepararse el anticuerpo anti-CD40 utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluidos los métodos descritos anteriormente en el presente documento. En una forma de realización, el anticuerpo anti-CD40 se produce por recombinación en una línea celular CHO.

40 Cuando el anticuerpo anti-CD40 va a ser almacenado antes de su formulación, puede congelarse, por ejemplo, a ≤ -20°C, y a continuación descongelarse a temperatura ambiente para su posterior formulación. La formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD40. La cantidad de anticuerpo de la misma presente en la formulación tiene en cuenta la vía de administración y el volumen de dosis deseado.

45 De esta manera, la composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo anti-CD40 a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 50,0 mg/ml, de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 40,0 mg/ml, de aproximadamente 1,0 mg/ml a aproximadamente 30,0 mg/ml, de aproximadamente 5,0 mg/ml a aproximadamente 25,0 mg/ml, de aproximadamente 5,0 mg/ml a aproximadamente 20,0 mg/ml, o de aproximadamente 15,0 mg/ml a aproximadamente 25,0 mg/ml. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo anti-CD40 a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 5,0 mg/ml, de aproximadamente 5,0 mg/ml a aproximadamente 10,0 mg/ml, de aproximadamente 10,0 mg/ml a aproximadamente 15,0 mg/ml, de aproximadamente 15,0 mg/ml a aproximadamente 20,0 mg/ml, de aproximadamente 20,0 mg/ml a aproximadamente 25,0 mg/ml, de aproximadamente 25,0 mg/ml a aproximadamente 30,0 mg/ml, de aproximadamente 30,0 mg/ml a aproximadamente 35,0 mg/ml, de aproximadamente 35,0 mg/ml a aproximadamente 40,0 mg/ml, de aproximadamente 40,0 mg/ml a aproximadamente 45,0 mg/ml, o de aproximadamente 45,0 mg/ml a aproximadamente 50,0 mg/ml. En otras formas de realización, la composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo anti-CD40 a 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 y un tampón que mantiene el pH de la formulación en el intervalo comprendido entre aproximadamente pH 5,0 y aproximadamente pH 7,0, incluidos aproximadamente pH 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, y otros valores semejantes dentro del intervalo comprendido entre aproximadamente pH 5,0 y aproximadamente pH 7,0. En algunas formas de realización, el tampón mantiene el pH de la formulación en el intervalo comprendido entre aproximadamente pH 5,0 y aproximadamente pH 6,5, aproximadamente pH 5,0 y aproximadamente pH 6,0,

aproximadamente pH 5,0 y aproximadamente pH 5,5, aproximadamente pH 5,5 y aproximadamente 7,0, aproximadamente pH 5,5 y aproximadamente pH 6,5, o aproximadamente pH 5,5 y aproximadamente pH 6,0.

5 Puede utilizarse en la formulación cualquier tampón adecuado que mantenga el pH de la formulación líquida de anticuerpo anti-CD40 en el intervalo comprendido entre aproximadamente pH 5,0 y aproximadamente pH 7,0, siempre que se conserven la estabilidad fisicoquímica y la actividad biológica deseada del anticuerpo, como se ha indicado anteriormente en el presente documento. Los tampones adecuados incluyen, pero no se limitan a, ácidos convencionales y sales de los mismos, en los que el contraión puede ser, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o magnesio. Ejemplos de ácidos convencionales y sales de los mismos que pueden utilizarse para amortiguar la formulación farmacéutica líquida incluyen, pero no se limitan a, los tampones 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 de tampón en la formulación puede ser de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, incluidos 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 comprendido entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 50 mM. En algunas formas de realización, la concentración de tampón en la formulación es de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, incluidos 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 comprendido entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 15 mM.

10

15

20

En algunas formas de realización, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD40 y tampón succinato o citrato a una concentración que mantiene el pH de la formulación en el intervalo comprendido entre aproximadamente pH 5,0 y aproximadamente pH 7,0, preferentemente entre aproximadamente pH 5,0 y aproximadamente pH 6,5. "Tampón succinato" o "tampón citrato" se refieren a un tampón que comprende una sal de ácido succínico o una sal de ácido cítrico, respectivamente. En una forma de realización preferente, el contraión del succinato o citrato es el catión sodio, y por lo tanto el tampón succinato de sodio o citrato de sodio, respectivamente. Sin embargo, se espera que sea eficaz cualquier catión. Otros posibles cationes de succinato o citrato incluyen, pero no se limitan a, potasio, amonio, calcio y magnesio. Como se ha indicado anteriormente, la concentración de tampón succinato o citrato en la formulación puede ser de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, incluidos 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 comprendido entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 50 mM. En algunas formas de realización, la concentración de tampón en la formulación es de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, incluidos 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 a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 50,0 mg/ml, o de aproximadamente 5,0 mg/ml a 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 a aproximadamente 20 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, preferentemente aproximadamente 10 mM.

25

30

35

40

Cuando resulte deseable que la formulación farmacéutica líquida sea casi isotónica, la formulación farmacéutica líquida que comprende el anticuerpo anti-CD40 y un tampón puede comprender adicionalmente una cantidad de un agente isotonizante suficiente para hacer la formulación casi isotónica. "Casi isotónica" se refiere a que la formulación acuosa tiene una osmolaridad de aproximadamente 240 mmol/kg a aproximadamente 360 mmol/kg, preferentemente de aproximadamente 240 mmol/kg a aproximadamente 340 mmol/kg, más preferentemente de aproximadamente 250 mmol/kg a aproximadamente 330 mmol/kg, incluso más preferentemente de aproximadamente 260 mmol/kg a aproximadamente 320 mmol/kg, aún más preferentemente de aproximadamente 270 mmol/kg a aproximadamente 310 mmol/kg. Los expertos en la materia conocen los métodos para determinar la isotonicidad de una disolución. Véase, por ejemplo, Setnikar *et al.* (1959) J. Am. Pharm. Assoc. 48:628.

45

50

Los expertos en la materia están familiarizados con diversos solutos farmacéuticamente aceptables útiles para proporcionar isotonicidad en las composiciones farmacéuticas. El agente isotonizante puede ser cualquier reactivo capaz de ajustar la presión osmótica de la formulación farmacéutica líquida de la presente invención hasta un valor casi igual al de un fluido corporal. Es deseable utilizar un agente isotonizante fisiológicamente aceptable. Por lo tanto, la formulación farmacéutica líquida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD40 y un tampón puede comprender adicionalmente componentes que pueden utilizarse para proporcionar isotonicidad, por ejemplo, cloruro de sodio; aminoácidos tales como alanina, valina y glicina; azúcares y alcoholes de azúcares (polioles), incluidos, pero no limitados a, glucosa, dextrosa, fructosa, sacarosa, maltosa, manitol, trehalosa, glicerol, sorbitol y xilitol; ácido acético, otros ácidos orgánicos o sus sales, y cantidades relativamente menores de citratos o fosfatos. El experto conocerá agentes adicionales que resultan adecuados para proporcionar la tonicidad óptima de la formulación líquida.

55

60

En algunas formas de realización preferentes, la formulación farmacéutica líquida que comprende un anticuerpo anti-CD40 y un tampón comprende adicionalmente cloruro de sodio como agente isotonizante. La concentración de cloruro de sodio en la formulación dependerá de la contribución de los demás componentes a la

65

tonicidad. En algunas formas de realización, la concentración de cloruro de sodio es de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 250 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 175 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM, de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 175 mM, de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 150 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 175 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 150 mM, de aproximadamente 125 mM a aproximadamente 175 mM, de aproximadamente 125 mM a aproximadamente 150 mM, de aproximadamente 130 mM a aproximadamente 170 mM, de aproximadamente 130 mM a aproximadamente 160 mM, de aproximadamente 135 mM a aproximadamente 155 mM, de aproximadamente 140 mM a aproximadamente 155 mM, o de aproximadamente 145 mM a aproximadamente 155 mM. En una de tales formas de realización, la concentración de cloruro de sodio es aproximadamente 150 mM. En otras 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 a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD40 y la formulación tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,0, de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,0, o de aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente pH 6,5. En otras formas de realización, la formulación farmacéutica líquida comprende el anticuerpo anti-CD40 a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 50,0 mg/ml o de aproximadamente 5,0 mg/ml a 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.

Puede inhibirse la degradación de proteínas debida a la congelación y descongelación o al cizallamiento mecánico durante el procesamiento de una formulación farmacéutica líquida de la presente invención incorporando tensioactivos en la formulación con el fin de disminuir la tensión superficial en la interfase solución-aire. Por lo tanto, en algunas formas de realización, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD40, un tampón, y comprende adicionalmente un tensioactivo. En otras formas de realización, la formulación farmacéutica líquida comprende un anticuerpo anti-CD40, un tampón, un agente isotonizante, y comprende adicionalmente un tensioactivo.

Los tensioactivos típicos empleados son tensioactivos no iónicos, incluidos ésteres de sorbitol de polioxietileno 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 productos farmacéuticos mediante tensioactivos o emulsionantes se describe, por ejemplo, en Levine *et al.* (1991) J. Parenteral Sci. Technol. 45 (3):160-165. Un tensioactivo preferente empleado en la práctica de la presente invención es polisorbato 80. Cuando se incluye un tensioactivo, éste se añade por lo general en una cantidad de aproximadamente un 0,001% a aproximadamente un 1,0% (p/v), de aproximadamente un 0,001% a aproximadamente un 0,5%, de aproximadamente un 0,001% a aproximadamente un 0,4%, de aproximadamente un 0,001% a aproximadamente un 0,3%, de aproximadamente un 0,001% a aproximadamente un 0,2%, de aproximadamente un 0,005% a aproximadamente un 0,5%, de aproximadamente un 0,005% a aproximadamente un 0,2%, de aproximadamente un 0,01% a aproximadamente un 0,5%, de aproximadamente un 0,01% a aproximadamente un 0,2%, de aproximadamente un 0,03% a aproximadamente un 0,5%, de aproximadamente un 0,03% a aproximadamente un 0,3%, de aproximadamente un 0,05% a aproximadamente un 0,5%, o de aproximadamente un 0,05% a aproximadamente un 0,2%.

Por lo tanto, en algunas formas de realización, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD40, el tampón es tampón succinato de sodio o citrato de sodio a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM; la formulación tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,0, de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,0, o de aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente pH 6,5; y la formulación comprende adicionalmente un tensioactivo, por ejemplo, polisorbato 80, en una cantidad de aproximadamente un 0,001% a aproximadamente un 1,0% o de aproximadamente un 0,001% a aproximadamente un 0,5%. Tales formulaciones pueden comprender opcionalmente un agente isotonizante, tal como cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM, o de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM. En otras formas de realización, la formulación farmacéutica líquida comprende el anticuerpo anti-CD40 a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 50,0 mg/ml o de aproximadamente 5,0 mg/ml a aproximadamente 25,0 mg/ml, incluidas aproximadamente 20,0 mg/ml; cloruro de sodio aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM, incluido cloruro de sodio aproximadamente 150 mM; succinato de sodio o citrato de sodio aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM, incluidos succinato de sodio o citrato de sodio aproximadamente 10 mM; cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM, incluida aproximadamente 150 mM; y opcionalmente un tensioactivo, por ejemplo, polisorbato 80, en una cantidad de aproximadamente un 0,001% a aproximadamente un 1,0%, incluidas de aproximadamente un 0,001% a aproximadamente un 0,5%; en las que la formulación farmacéutica líquida tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,0, de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH

6,0, de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 5,5, de aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente pH 6,5, o de aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente pH 6,0.

La formulación farmacéutica líquida puede carecer esencialmente de cualquier conservante y otros vehículos, excipientes o estabilizadores indicados anteriormente en el presente documento. Como alternativa, la formulación puede incluir uno o más conservantes, por ejemplo, agentes antibacterianos, vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables descritos anteriormente en el presente documento siempre que no influyan negativamente en la estabilidad fisicoquímica del anticuerpo anti-CD40. Los ejemplos de vehículos, excipientes y estabilizadores aceptables incluyen, pero no se limitan a, codisolvientes, tensioactivos, antioxidantes, incluidos ácido ascórbico y metionina, quelantes tales como EDTA, complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn -proteína), polímeros biodegradables tales como poliésteres y agentes reguladores del pH adicionales. Puede encontrarse una análisis detallado de la formulación y selección de vehículos, estabilizadores y osmolitos farmacéuticamente aceptables en Remington Pharmaceutical Sciences (18^a ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990).

“Vehículos”, tal como se utiliza en el presente documento incluye vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o el mamífero expuesto a los mismos a las dosis y concentraciones empleadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa tamponada. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato, succinato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluido el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos, incluidas glucosa, manosa o dextrinas; quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN, polietilenglicol (PEG) y Pluronics.

La administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (al mismo tiempo) y consecutiva en cualquier orden.

Después de preparada la formulación farmacéutica líquida u otra composición farmacéutica descrita en el presente documento, ésta puede liofilizarse para evitar su degradación. Los expertos habituales en la técnica conocen los métodos para liofilizar composiciones líquidas. Justo antes de su uso, 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 preferentemente a los sujetos utilizando los métodos conocidos para los expertos en la materia.

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-CD40 pueden administrarse en combinación con al menos otro tratamiento conocido para las enfermedades inflamatorias y/o autoinmunitarias. Dichos tratamientos incluyen, pero no se limitan a, cirugía o procedimientos quirúrgicos (por ejemplo, esplenectomía, linfadenectomía, tiroidectomía, plasmaféresis, leucoforesis, trasplante de células, tejidos u órganos, procedimientos intestinales, perfusión de órganos, y similares), radioterapia, tratamiento tal como tratamiento con esteroides y tratamiento no esteroideo, tratamiento hormonal, tratamiento con citocinas, tratamiento con agentes dermatológicos (por ejemplo, agentes tópicos utilizados para tratar afecciones de la piel tales como las alergias, la dermatitis por contacto y la psoriasis), tratamiento inmunosupresor, y otro tratamiento antiinflamatorio con anticuerpos monoclonales, y similares. Cuando los métodos descritos en el presente documento comprenden regímenes terapéuticos combinados, estos tratamientos pueden darse de forma simultánea, es decir, el anticuerpo anti-CD40 antagonista o fragmento de unión a antígeno del mismo se administra al mismo tiempo que, o dentro del mismo plazo de tiempo que, el otro tratamiento (es decir, los tratamientos se empiezan a tomar al mismo tiempo, pero el anticuerpo anti-CD40 o fragmento de unión a antígeno no se administra exactamente al mismo tiempo que el otro tratamiento). Como alternativa, el anticuerpo anti-CD40 antagonista de la presente invención o fragmentos de unión a antígeno del mismo también puede administrarse antes o después del otro tratamiento. La administración secuencial de los diferentes tratamientos puede realizarse independientemente de si el sujeto tratado responde al primer ciclo terapéutico para disminuir la posibilidad de remisión o recaída.

De esta manera, los anticuerpos anti-CD40 se administran en combinación con al menos otro tratamiento, incluido, pero no limitado a, cirugía, perfusión de órganos, radioterapia, tratamiento con esteroides, tratamiento no esteroideo, tratamiento con antibióticos, tratamiento con antifúngicos, tratamiento hormonal, tratamiento con citocinas, tratamiento con agentes dermatológicos (por ejemplo, agentes tópicos utilizados para tratar afecciones de la piel tales como las alergias, la dermatitis por contacto y la psoriasis), tratamiento inmunosupresor, otro tratamiento antiinflamatorio con anticuerpos monoclonales, combinaciones de los mismos, y similares. Por lo tanto, cuando los tratamientos combinados comprenden la administración de un anticuerpo anti-CD40 en combinación con la administración de otro agente terapéutico, como con esteroides como ejemplo, los métodos de la invención abarcan la coadministración, utilizando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden.

Los ejemplos de fármacos inmunosupresores que pueden administrarse en combinación con anticuerpos

5 anti-CD40 incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, ciclofosfamida, mizoribina, clorambucilo, ciclosporina, tal como, por ejemplo, ciclosporina aerosolizada (véase, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. Nº US20020006901), tacrolimus (FK506; ProGraf™), micofenolato mofetil, y azatioprina (6-mercaptopurina), sirolimus (rapamicina), desoxiespergualina, leflunomida y sus análogos malononitriloamida; y proteínas inmunosupresoras, incluidas.

10 Los ejemplos de agentes antiinflamatorios adecuados que pueden administrarse en combinación con anticuerpos anti-CD40 incluyen, pero no se limitan a, corticosteroides tales como, por ejemplo, clobetasol, halobetasol, hidrocortisona, triamcinolona, betametasona, fluocinol, fluocinonida, prednisona, prednisolona, metilprednisolona; fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tales como, por ejemplo, sulfasalazina, medicamentos que contienen mesalamina (conocidos como agentes 5-ASA), celecoxib, diclofenaco, etodolaco, fenprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, ketoprofeno, meclofamato, meloxicam, nabumetona, naproxeno, oxaprozina, piroxicam, rofecoxib, salicilatos, sulindac y tolmetina; Enbrel® (un receptor de FNT soluble), anticuerpos antiinflamatorios tales como adalimumab (Humira®, un antagonista del FNT- α) e infliximab (Remicade®, un antagonista del FNT- α), y similares.

15 El rechazo del trasplante y la enfermedad de injerto contra hospedador puede ser hiperagudo (humoral), agudo (dependiente de linfocitos T), o crónico (de etiología desconocida), o una combinación de los mismos. Por lo tanto, los anticuerpos anti-CD40 de la invención se utilizan en algunas formas de realización para prevenir y/o mejorar el rechazo y/o los síntomas asociados con el rechazo de trasplante hiperagudo, agudo y/o crónico de cualquier tejido, incluido, pero no limitado a, hígado, riñón, páncreas, células de los islotes pancreáticos, intestino delgado, pulmón, corazón, córneas, piel, vasos sanguíneos, hueso, médula ósea heteróloga o autóloga, y similares. Los tejidos de injerto pueden obtenerse a partir de cualquier donante y transplantarse en cualquier hospedador receptor, y por lo tanto el procedimiento de trasplante puede comprender el trasplante de tejido animal a seres humanos (por ejemplo, xenoinjertos), trasplante de tejido de un ser humano a otro ser humano (por ejemplo, aloinjertos), y/o trasplante de tejido de una parte del cuerpo de un ser humano a otra parte (por ejemplo, autoinjertos). El tratamiento con los anticuerpos de la invención también puede reducir las secuelas del trasplante tales como fiebre, anorexia, anomalías hemodinámicas, leucopenia, infiltración de leucocitos del órgano/tejido transplantado, así como infecciones oportunistas.

20 30 En las formas de realización en las que los anticuerpos anti-CD40 de la invención se utilizan para tratar el rechazo de injerto, la artritis reumatoide o la esclerosis múltiple, los anticuerpos pueden utilizarse en combinación con fármacos inmunosupresores adecuados como se describe en el presente documento.

25 35 Por lo tanto, la invención proporciona el uso de una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40 en un paciente humano homocigótico o heterocigótico para FcγRIIIa-158F (genotipo F/F o V/F), en el que el medicamento se coordina con el tratamiento con al menos otro tratamiento.

40 45 "Coordinar" se refiere a que el medicamento que comprende el anticuerpo anti-CD40 se utilizará antes, durante o después del tratamiento del sujeto con al menos otro tratamiento.

50 La invención también proporciona el uso de un anticuerpo anti-CD40 en la fabricación de un medicamento para tratar a un paciente humano de una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40, en el que dicho paciente humano es homocigótico o heterocigótico para FcγRIIIa-158F (genotipo F/F o V/F) y ha sido tratado previamente con al menos otro agente terapéutico.

55 60 "Tratado previamente" o "tratamiento previo" se refiere a que el sujeto ha recibido uno o más de otros tratamientos (es decir, ha sido tratado con al menos otro tratamiento) antes de recibir el medicamento que comprende el anticuerpo anti-CD40. "Tratado previamente" o "tratamiento previo" incluye sujetos que han sido tratados con al menos otro tratamiento dentro de los 2 años, los 18 meses, el primer año, los 6 meses, los 2 meses, las 6 semanas, el primer mes, las 4 semanas, las 3 semanas, las 2 semanas, la primera semana, los 6 días, los 5 días, los 4 días, los 3 días, los 2 días o incluso en el día anterior a iniciarse el tratamiento con el medicamento que comprende el anticuerpo anti-CD40. No es necesario que el sujeto fuese respondedor al tratamiento previo con el tratamiento anterior o los tratamientos anteriores. Por lo tanto, el sujeto que recibe el medicamento que comprende el anticuerpo anti-CD40 antagonista podría haber respondido, o podría no haber respondido (es decir, la enfermedad era resistente), al tratamiento previo con el tratamiento anterior, o a uno o más de los tratamientos anteriores en los que tratamiento previo comprendía múltiples tratamientos. Los ejemplos de otros tratamientos para los que un sujeto puede haber recibido tratamiento previo antes de recibir el medicamento que comprende el anticuerpo anti-CD40 incluyen, pero no se limitan a los tratamientos para las enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias descritas en el presente documento.

65 "Tratamiento" en el contexto del uso coordinado de un medicamento descrito en el presente documento con uno o más de otros tratamientos se define en el presente documento como la aplicación o administración del medicamento o del otro tratamiento a un sujeto, o la aplicación o administración del medicamento u otro tratamiento

5 a una línea celular o tejido aislado de un sujeto, en el que el sujeto tiene una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40, un síntoma asociado con una enfermedad de ese tipo, o una predisposición a desarrollar una enfermedad de ese tipo, en el que el fin es curar, sanar, mitigar, aliviar, modificar, remediar, recuperarse de, mejorar o influir en la enfermedad, cualquier síntoma asociado de la enfermedad, o la predisposición a desarrollar la enfermedad.

10 En algunas formas de realización, el tratamiento de combinación proporciona una mejora sinérgica de la eficacia terapéutica con respecto a los agentes terapéuticos individuales cuando se administran en solitario. El término "sinergia" se utiliza para describir un efecto combinado de dos o más agentes activos que es superior a la suma de los efectos individuales de cada agente activo respectivo. Por lo tanto, cuando el efecto combinado de dos o más agentes da como resultado la "inhibición sinérgica" de una actividad o proceso, se quiere decir que la inhibición de la actividad o proceso es superior a la suma de los efectos inhibitorios de cada agente activo respectivo. La expresión "efecto terapéutico sinérgico" se refiere a un efecto terapéutico observado con una combinación de dos o más tratamientos en el que el efecto terapéutico (según se mide mediante cualquiera de varios parámetros) es superior a la suma de los efectos terapéuticos individuales observados con los respectivos tratamientos individuales.

15

20 A continuación se describirán con más detalle diversos aspectos y formas de realización de la presente invención, a modo de ejemplo solamente. Se entenderá que pueden modificarse los detalles sin alejarse del alcance de la invención.

PARTE EXPERIMENTAL

25 El anticuerpo anti-CD40 utilizado en los ejemplos que se presentan más adelante es CHIR-12.12. La producción, secuenciación y caracterización del anticuerpo CHIR-12.12 se describe detalladamente en las solicitudes de patente internacional publicadas como WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307 y WO 2005/044294. La línea de hibridoma 153.8E2.D10.D6.12.12 (CMCC#12056) que expresa el anticuerpo CHIR-12.12 se ha depositado en la American Type Culture Collection [ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209 (EE.UU)] con el número de depósito de patente PTA- 5543.

30

35 Varios de los siguientes ejemplos se basan en la unión de CHIR-12.12 a líneas celulares cancerosas y células de pacientes con cáncer. Sin embargo, todos los ejemplos siguientes están directamente relacionados con el uso de CHIR-12.12 para tratar enfermedades inflamatorias y/o enfermedades autoinmunitarias, porque ilustran características del anticuerpo CHIR-12.12 que son igualmente pertinentes para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y/o enfermedades autoinmunitarias utilizando anticuerpos anti-CD40.

Ejemplo 1: Análisis de ADCC en líneas celulares

40 Se compararon CHIR-12.12 y rituximab por su actividad ADCC relativa contra diversas líneas de linfocitos B malignos que expresan抗ígenos CD40 y CD20, incluidas líneas celulares de linfoma (Daudi, Namalwa), líneas celulares de mieloma múltiple (ARH77, IM-9), una línea celular B-ALL (CCPR-SB) y una línea celular B-CLL (EHEB).

45 Se compararon la eficacia y la potencia de ADCC medida como el máximo porcentaje de lisis y DE50, respectivamente, para CHIR-12.12 y rituximab. Los resultados de estos experimentos se muestran en las Figuras 1A-1F. Para todas las líneas celulares diana, CHIR-12.12 era un mediador más potente y eficaz de la ADCC que rituximab. En las seis líneas celulares ensayadas, el número de moléculas CD20 de superficie celular por célula fue 2,6 a 30,8 veces superior al de CD40. Estos datos muestran que a pesar de tener expuestas un menor número de moléculas CD40 que de CD20, las líneas de linfocitos B malignos son lisadas con mayor eficacia por CHIR-12.12 que por rituximab.

50

Ejemplo 2: Análisis de ADCC en células de pacientes con LLC

55 Se comparó la actividad ADCC relativa de CHIR-12.12 y rituximab contra células primarias de LLC ex vivo de 8 pacientes. CHIR-12.12 presentó mayor ADCC que rituximab contra la LLC de todos los pacientes (véase la Figura 2A-D y la Figura 3). Los resultados se resumen en la Figura 3. CHIR-12.12 es más potente que rituximab.

Diseño experimental de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)

60 Células Diana: células de pacientes con LLC, 5.000/pocillo. Células Efectoras: linfocitos NK humanos normales purificados, 50.000/pocillo. Relación E:D: 10. Concentración de Abs: 0,00001 µg/ml, 0,0001 µg/ml, 0,001 µg/ml, 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml y 10 µg/ml. Tiempo de incubación: 4 horas. Medio de cultivo: RPMI (sin rojo de fenol) + FBS al 10% + P/S al 1%. Dispositivo de cultivo: placa de fondo redondo de 96 pocillos. Lectura: liberación de calceína AM medida mediante unidades arbitrarias de fluorescencia (AFU) con 485 nm de excitación/535 nm de emisión. Cálculo: % de lisis específica = 100 x (ensayo AFU - liberación espontánea AFU) / (liberación máxima AFU)

65

– liberación espontánea AFU). Testigo negativo: calceína liberada por las células diana en ausencia de anticuerpo o linfocitos NK. Testigo positivo: calceína liberada por las células diana tras la lisis por el detergente (NP40 al 1%).

Los resultados ilustrados en las Figuras 2 y 3 demuestran que CHIR-12.12 interviene en una mayor ADCC que rituximab contra las células de pacientes con LLC. La magnitud de la diferencia de ADCC puede depender de las células diana o de las células donantes NK pero se observó frente a todas las muestras de pacientes. Cuando se ensayaron las células de LLC de un solo paciente con dos donantes NK diferentes, CHIR-12.12 intervenía en una mayor ADCC que rituximab, para ambas células donantes NK, aunque la magnitud de la ADCC diferencial no fue idéntica (véase la Figura 4). La base mecanicista para esta ADCC superior podría incluir los niveles relativos de expresión de los antígenos diana (CD20 y CD40), el grado de internalización del anticuerpo y la afinidad del anticuerpo por el receptor Fc_YRIIIa en los linfocitos NK. Por lo tanto, se investigó la influencia de estos factores sobre la actividad ADCC de CHIR-12.12 y rituximab.

Ejemplo 3: Cuantificación de moléculas CD40 y CD20 de superficie celular

Se investigaron la densidad cuantitativa de CD40 y CD20 en las células de LLC (Ejemplo 3) y el grado de internalización del anticuerpo (Ejemplo 4) como posibles razones para la diferencia anteriormente descrita en la actividad ADCC. La mayor actividad ADCC y eficacia de CHIR-12.12 no era dependiente de una mayor densidad de moléculas CD40 de superficie celular, ya que había 1,3 a 14 veces mayor número de CD20 que de moléculas CD40 en la superficie celular (véase la Figura 5 y la Figura 6).

Métodos

Se preincubaron las células con IgG1 humana a 1 mg/ml en tampón de tinción (el PBS contiene BSA al 1%, azida de sodio al 0,1%) para bloquear los sitios de unión no específica. Se incubaron durante 30 minutos a 4°C (en hielo). A continuación, se añadió el testigo isotipo IgG1 humana conjugado con FITC, CHIR-12.12 conjugado con FITC, o rituximab conjugado con FITC a 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0,1 µg/ml, y se incubaron las células durante 30 minutos a 4°C (en hielo). Se lavaron las células con tampón de tinción (PBS + FBS al 1% + azida de sodio al 0,1%), y se analizaron mediante FACS Calibur.

Se midió la media geométrica de la intensidad de fluorescencia mediante FACS. A continuación se calcularon las moléculas de fluorocromo soluble equivalente (MESF) en base a la curva estándar establecida por las perlas FITC calibradas.

Ejemplo 4: CHIR-12.12 no induce la internalización tras la unión a CD40 en las líneas celulares

Se utilizaron Daudi, una línea celular de linfoma, y ARH77, una línea celular MM, para evaluar el efecto de la unión de CHIR-12.12 sobre la internalización. Se incubaron las células con IgG1 humana (anticuerpo testigo) o CHIR-12.12 a 1 µg/ml en hielo (con azida de sodio al 0,1% para bloquear la internalización) o a 37°C (sin azida de sodio) durante 3 horas. Después de un lavado con tampón de tinción frío (PBS + BSA al 1% + azida de sodio al 0,1%), se tiñeron las células con FITC-IgG antihumano de cabra durante 30 minutos en hielo. Se registró la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (MFI) mediante FACS Calibur. No se observó ninguna diferencia en la MFI entre las células incubadas con CHIR-12.12 en hielo en presencia de azida de sodio o a 37°C en ausencia de azida de sodio (Figura 7). Estos datos demuestran que CHIR-12.12, tras la unión a CD40, no se internaliza y se mantiene expuesto en la superficie celular.

Ejemplo 5: Internalización de CHIR-12.12 y Rituximab después de unirse a las células de pacientes con LLC: FACS y microscopio confocal

Metodología FACS

Se incubaron las células con hulgG1, CHIR-12.12 o rituximab a 10 µg/ml durante 3 horas a 40°C (con azida de sodio al 0,1%) o a 37°C (sin azida de sodio). Se lavaron las células con tampón de tinción (PBS + FBS al 1% + azida de sodio al 0,1%), a continuación se añadió FITC-IgG antihumano de cabra, y a continuación se incubaron las células durante 30 minutos a 40°C, y se analizaron mediante FACS Calibur.

Metodología con microscopio confocal

Se incubaron las células con Alexa 488 o CHIR-12.12 conjugado con FITC, rituximab, e IgG1 a 10 µg/ml, durante 3 horas a 40°C (con azida de sodio al 0,1%) o a 37°C (sin azida de sodio). A continuación se lavaron las células y se fijaron con formaldehído al 2%, durante 5 minutos a TA. A continuación se lavaron las células y se colocaron en portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina, se montaron y se sellaron, y a continuación se analizaron mediante microscopía confocal.

Resultados

Los resultados de estos experimentos se ilustran en la Figura 8 (FACS) y en las Figuras 9 y 10 (microscopio confocal). Los resultados de estos experimentos se resumen en la Figura 11. Estos estudios de internalización de anticuerpos utilizando células primarias de LLC llevados a cabo mediante citometría de flujo y microscopía confocal demuestran que tras la unión a CD40 a 37°C, CHIR-12.12 permanece uniformemente distribuido en la superficie celular, incluso después de 3 horas. Por el contrario, después de la unión a 37°C, rituximab se redistribuye en balsas y se internaliza. Estos datos sugieren que la potente actividad ADCC de CHIR-12.12 puede estar relacionada con su capacidad para exponerse de manera uniforme en la superficie de las células diana, lo que permite una interacción óptima con las células efectoras. Estos resultados sugieren que CHIR-12.12 pueden ser eficaz como mediador de una ADCC potente contra las células de LLC *in vivo*.

Ejemplo 6: Análisis Biacore de la unión de FcyRIIIa por Rituxan® y CHIR-12.12

Se compararon las afinidades de los alelos aa158F y aa158V de FcyRIIIa por CHIR-12.12 y rituximab mediante un análisis Biacore® convencional. CHIR-12.12 se unía al alelo aa158F con una afinidad 4,6 veces superior en comparación con rituximab (K_D de 2,8 μM frente a 13 μM , respectivamente). Los resultados de estos experimentos se resumen en la siguiente tabla:

	K_D (nM)	
	CHIR-12.12	Rituximab
FcyRIIIa 158V	492	466
FcyRIIIa 158F	2.800	13.000

Ejemplo 7: El efecto del polimorfismo de FcyRIIIa en la ADCC por las células efectoras NK

La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) es un importante mecanismo de acción para muchos anticuerpos monoclonales comercializados y en investigación. Se cree que rituximab (Rituxan®), comercializado para el tratamiento del linfoma no hodgkiniano folicular (LNH) y activo en otras neoplasias de linfocitos B, tiene la ADCC como uno de sus principales mecanismos de acción. Cabe destacar que se ha demostrado que la actividad clínica de rituximab en el LNH se correlaciona con el genotipo de FcyRIIIa. Los pacientes con el polimorfismo FcyRIIIa-aa158 de V/V o V/F son más sensibles a rituximab que aquellos con F/F (por ejemplo, véase Cartron *et al.* (2002) Blood 99(3):754-758 o Dall'Ozzo *et al.* (2004) Cancer Res. 64:4664-4669).

En estos experimentos, se evaluaron las células efectoras NK purificadas de múltiples donantes humanos que expresaban diversos polimorfismos FcyRIIIa-aa158 utilizando la línea celular Daudi de linfoma humano como células diana (véanse las Figuras 12 y 13). Como ilustran esas figuras, CHIR-12.12 inducía una potente ADCC con linfocitos NK de los tres genotipos. Las DE_{50} de CHIR-12.12 para la lisis de la línea celular Daudi fueron 4 pM, 2 pM y 0,4 pM para F/F, V/F y V/V, respectivamente (Figura 13). Las DE_{50} de rituximab para la lisis de la línea celular Daudi fueron 53 pM, 21 pM y 9 pM para F/F, V/F y V/V, respectivamente (Figura 13).

También se evaluaron las células efectoras NK purificadas de múltiples donantes humanos que expresaban diversos polimorfismos FcyRIIIa-aa158, utilizando las células de pacientes con LLC como células diana (véase la Figura 14). Se descubrió que CHIR-12.12 era un mediador más potente de la ADCC que rituximab contra todas las células ensayadas de pacientes con LLC (Figura 14). Estos datos sugieren que CHIR-12.12 es un mediador de la ADCC más potente que rituximab, incluso con los linfocitos NK del genotipo F/F o V/F del aa158.

Estos resultados son sorprendentes porque habría sido de esperar que CHIR-12.12 fuese significativamente menos potente en los ensayos de ADCC utilizando linfocitos NK con el polimorfismo FcyRIIIa-aa158 de F/F o V/F que aquellos con V/V. Una vez más, se ha demostrado que la actividad clínica de rituximab en el LNH se correlaciona con el genotipo de FcyRIIIa. Los pacientes con el polimorfismo FcyRIIIa-aa158 de V/V o V/F son más sensibles a rituximab que aquellos con F/F. Rituximab es también un anticuerpo monoclonal IgG1 que se une a un antígeno expreso en la superficie de los linfocitos B, y por tanto habría sido de esperar que CHIR-12.12 mostrara la misma preferencia por el polimorfismo FxyRIIIa-158V. En cambio, se descubrió que CHIR-12.12 induce una potente ADCC con linfocitos NK de los tres genotipos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Aukerman, Sharon Lea Luqman, Mohammad

<120> Usos de anticuerpos anti-CD40

<130> PP028185.0002(319124)

65 <150> 60/732.580
<151> 01-11-2005

ES 2 428 089 T3

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 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
 25 <210> 2
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Cadena ligera del anticuerpo anti-CD40 humano 12.12
 <400> 2
 35 Met Ala Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Thr
 20 25 30
 40 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
 45 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Val Leu Ile Ser Leu Gly Ser Asn Arg Ala
 65 70 75 80
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe 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
 50 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
 55 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
 60 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
 65 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

5 <210> 3
 <211> 2016
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Secuencia codificante para la cadena pesada del anticuerpo anti-CD40 humano 12.12 (con intrones)
 <400> 3

15	atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctt gtt gct att tta aga ggt	48
	gtc cag tgt cag gtg cag ttg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag	96
	cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc	144
	agt agc tat ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg	192
	gag tgg gtg gca gtt ata tca tat gag gaa agt aat aga tac cat gca	240
	gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag atc	288
20	acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctc aga act gag gac acg gct gtg	336
	tat tac tgt gcg aga gat ggg ggt ata gca gca cct ggg cct gac tac	384
	tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca gca agt acc aag ggc	432
	cca tcc gtc ttc ccc ctg gcg ccc gct agc aag agc acc tct ggg ggc	480
	aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg	528
25	acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc	576
	ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg	624
	acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg	672
	aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt ggt gag agg	720
	cca gca cag gga ggg agg gtg tct gct gga agc cag gct cag cgc tcc	768
30	tgc ctg gac gca tcc cgg cta tgc agt ccc agt cca ggg cag caa ggc	816
	agg ccc cgt ctg cct ctt cac ccc gag gcc tct gcc cgc ccc act cat	864
	gct cag gga gag ggt ctt ctg gct ttt tcc cca ggc tct ggg cag gca	912
	cag gct agg tgc ccc taa ccc agg ccc tgc aca caa agg ggc agg tgc	960
	tgg gct cag acc tgc caa gag cca tat ccc gga gga ccc tgc ccc tga	1008
35	cct aag ccc acc cca aag gcc aaa ctc tcc act ccc tca gct cgg aca	1056
	cct tct ctc ctc cca gat tcc agt aac tcc caa tct tct ctc tgc aga	1104
	gcc caa atc ttg tga caa aac tca cac atg ccc acc gtg ccc agg taa	1152
	gcc agc cca ggc ctc gcc ctc cag ctc aag ggc gga cag gtg ccc tag	1200
	agt agc ctg cat cca ggg aca ggc ccc agc cgg gtg ctg aca cgt cca	1248
40	cct cca tct ctt cct cag cac ctg aac tcc tgg ggg gac cgt cag tct	1296
	tcc tct tcc ccc caa aac cca agg aca ccc tca tga tct ccc gga ccc	1344
	ctg agg tca cat ggc tgg tgg acg tga gcc acg aag acc ctg agg	1392
	tca agt tca act ggt acg tgg acg ggc tgg agg tgc ata atg cca aga	1440
	caa agc cgc ggg agg agc agt aca aca gca cgt acc gtg tgg tca gcg	1488
	tcc tca ccc tcc tgc acc agg act ggc tga atg gca agg agt aca agt	1536
45	gca agg tct cca aca aag ccc tcc cag ccc cca tgc aga aaa cca tct	1584
	cca aag cca aag gtc gga ccc gtg ggg tgc gag ggc cac atg gac aga	1632
	ggc cgg ctc ggc cca ccc tct gcc ctc aga gtg acc gct gta cca acc	1680
	tct gtc cct aca ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc	1728
	cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg	1776
50	gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat	1824
	ggg cag ccc gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc	1872
	gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg	1920
	tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg	1968
	cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga	2016
55	<210> 4 <211> 469 <212> PRT <213> Secuencia Artificial	
60	<220> <223> Cadena pesada del anticuerpo anti-CD40 humano 12.12	
	<400> 4	

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 Val Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

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

ES 2 428 089 T3

<210> 5
<211> 469
<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

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

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 Val Val Gln

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

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

<210> 6
<211> 612
<212> ADN

ES 2 428 089 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 7

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
15	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
20	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
25	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
30	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
35	Cys His Pro Trp Thr Arg Ser Pro Gly Ser Ala Glu Ser Pro Gly Gly 165 170 175 Asp Pro His His Leu Arg Asp Pro Val Cys His Pro Leu Gly Ala Gly 180 185 190 Leu Tyr Gln Lys Gly Gly Gln Glu Ala Asn Gln 195 200

40 <210> 8
 <211> 834
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

45 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(834)

50 <221> misc_feature
 <222> (0)...(0)
 <223> Secuencia codificante para la isoforma larga de CD40 humano

<400> 8

55

60

65

5	atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctc tgg ggc tgc ttg ctg acc Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr 1 5 10 15	48
10	gct gtc cat cca gaa cca ccc act gca tgc aga gaa aaa cag tac cta Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu 20 25 30	96
15	ata aac agt cag tgc tgt tct ttg tgc cag cca gga cag aaa ctg gtg Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val 35 40 45	144
20	agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc ctt cct tgc ggt gaa Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu 50 55 60	192
25	agc gaa ttc cta gac acc tgg aac aga gag aca cac tgc cac cag cac Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His 65 70 75 80	240
30	aaa tac tgc gac ccc aac cta ggg ctt cgg gtc cag cag aag ggc acc Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr 85 90 95	288
35	tca gaa aca gac acc atc tgc acc tgt gaa gaa ggc tgg cac tgt acg Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr 100 105 110	336
40	agt gag gcc tgt gag agc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tcg ccc ggc Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly	384
45		
50		
55		
60		
65		

ES 2 428 089 T3

	115	120	125	
5	ttt ggg gtc aag cag att gct aca ggg gtt tct gat acc atc tgc gag Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu 130	135	140	432
10	ccc tgc cca gtc ggc ttc tcc aat gtg tca tct gct ttc gaa aaa Pro Cys Pro Val Gly Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys 145	150	155	480
15	tgt cac cct tgg aca agc tgt gag acc aaa gac ctg gtt gtg caa cag Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln 165	170	175	528
20	gca ggc aca aac aag act gat gtt gtc tgt ggt ccc cag gat cgg ctg Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu 180	185	190	576
25	aga gcc ctg gtg atc ccc atc atc ttc ggg atc ctg ttt gcc atc Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile 195	200	205	624
30	ctc ttg gtg ctg gtc ttt atc aaa aag gtg gcc aag aag cca acc aat Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn 210	215	220	672
35	aag gcc ccc cac ccc aag cag gaa ccc cag gag atc aat ttt ccc gac Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp 225	230	235	720
40	gat ctt cct ggc tcc aac act gct gct cca gtg cag gag act tta cat Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His 245	250	255	768
45	gtg cag gag aga cag tga Val Gln Glu Arg Gln * 275			834
50	<210> 9 <211> 277 <212> PRT <213> Homo sapiens			
55	<400> 9			
60				
65				

	Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr			
5	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	
10	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	
15	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	
20	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
25	Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln			
	165	170	175	
	Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu			
	180	185	190	
30	Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile			
	195	200	205	
	Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn			
	210	215	220	
	Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp			
	225	230	235	240
35	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				

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo anti-CD40, para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40 en un paciente humano homocigótico o heterocigótico para Fc_YRIIIa-158F (genotipo F/F o V/F), en el que dicho anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en :
- 5 a) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como depósito de patente Nº PTA-5543;
 - 10 b) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo que comprende los restos 82-87 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID Nº:7 o la SEQ ID Nº:9; y
 - c) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como depósito de patente Nº PTA-5543 en un ensayo de unión competitiva.
- 15 2. Uso de una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40 en un paciente humano homocigótico o heterocigótico para Fc_YRIIIa-158F (genotipo F/F o V/F), en el que dicho anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en:
- 20 a) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como depósito de patente Nº PTA-5543;
 - b) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo que comprende los restos 82-87 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID Nº:7 o la SEQ ID Nº:9; y
 - 25 c) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como depósito de patente Nº PTA-5543 en un ensayo de unión competitiva.
- 30 3. Método para seleccionar un tratamiento con anticuerpos para tratar a un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria que es resistente al tratamiento con rituximab (Rituxan®), que comprende determinar el genotipo (V/V, V/F o F/F) de Fc_YRIIIa-158 de un paciente humano con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan CD40 y que es resistente al tratamiento con rituximab (Rituxan®) utilizando una muestra biológica obtenida del paciente humano; en el que, si dicho paciente humano es homocigótico o heterocigótico para Fc_YRIIIa-158F (genotipo F/F o V/F), se selecciona un anticuerpo anti-CD40 para tratar dicha enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria, en el que dicho anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en :
- 35 a) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como depósito de patente Nº PTA-5543;
 - b) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo que comprende los restos 82-87 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID Nº:7 o la SEQ ID Nº:9; y
 - 40 c) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como depósito de patente Nº PTA-5543 en un ensayo de unión competitiva.
- 45 4. Anticuerpo según la reivindicación 1, uso según la reivindicación 2 o método según la reivindicación 3, en el que dicha enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria está seleccionada del grupo que consiste en el lupus eritematoso sistémico (LES), el lupus discoide, la nefritis lúpica, la sarcoidosis, la artritis inflamatoria, incluidas la artritis juvenil, la artritis reumatoide, la artritis psoriásica, el síndrome de Reiter, la espondilitis anquilosante y la artritis gotosa, el rechazo de trasplante de órgano o tejido, el rechazo hiperagudo, agudo o crónico y/o la enfermedad de injerto contra hospedador, la esclerosis múltiple, el síndrome de hiper IgE, la poliarteritis nodosa, la cirrosis biliar primaria, la enfermedad inflamatoria intestinal, la enfermedad de Crohn, la enfermedad celíaca (enteropatía sensible al gluten), la hepatitis autoinmunitaria, la anemia perniciosa, la anemia hemolítica autoinmunitaria, la psoriasis, la esclerodermia, la miastenia grave, la púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, la tiroiditis autoinmunitaria, la enfermedad de Grave, la tiroiditis de Hasimoto, la enfermedad por inmunocomplejos, el síndrome de fatiga crónica y disfunción inmunitaria (CFIDS), la polimiositis y la dermatomiositis, la crioglobulinemia, la trombolisis, la cardiomiopatía, el pénfigo vulgar, la fibrosis pulmonar intersticial, la diabetes mellitus tipo I y tipo II, la hipersensibilidad retardada de tipo 1, 2, 3 y 4, la alergia o los trastornos alérgicos, las respuestas inmunitarias no deseadas/inesperadas a proteínas terapéuticas, el asma, el síndrome de Churg-Strauss (granulomatosis alérgica), la dermatitis atópica, la dermatitis por contacto alérgica e irritante, la urticaria, la alergia dependiente de IgE, la aterosclerosis, la vasculitis, las miopatías inflamatorias idiopáticas, la enfermedad hemolítica, la enfermedad de Alzheimer, y la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, la inflamación pulmonar incluida pero no limitada al rechazo de injerto pulmonar, el asma, la sarcoidosis, el enfisema, la fibrosis quística, la fibrosis pulmonar idiopática, la bronquitis crónica, la rinitis alérgica y las enfermedades alérgicas pulmonares tales como la neumonitis por hipersensibilidad, la neumonía eosinofílica, la bronquiolitis obliterante debida al trasplante de médula ósea y/o pulmón o a otras causas, la aterosclerosis del injerto/flebosclerosis del injerto, así como la fibrosis pulmonar por enfermedades autoinmunitarias, del colágeno y vasculares tales como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso.

5. Anticuerpo según la reivindicación 1, uso según la reivindicación 2 o método según la reivindicación 3, en el que dicha enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria es una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria asociada con células que expresan tanto CD40 como CD20.
- 5 6. Anticuerpo, uso o método según la reivindicación 5, en el que dicha enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria es la artritis reumatoide, la psoriasis, el lupus eritematoso sistémico, la enfermedad de Crohn, la miastenia grave, la púrpura trombocitopénica idiopática o el síndrome de Sjogren.
- 10 7. Anticuerpo, uso o método según la reivindicación 5, en el que dicha enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmunitaria es la esclerosis múltiple, el rechazo de injerto, la enfermedad de injerto contra hospedador, la enfermedad de Alzheimer o la diabetes.
- 15 8. Anticuerpo según la reivindicación 1, uso según la reivindicación 2 o método según la reivindicación 3, en el que dicho anticuerpo es el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como depósito de patente Nº PTA-5543.
- 20 9. Anticuerpo, uso o método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo anti-CD40 es un anticuerpo monoclonal humano.
10. Anticuerpo, uso o método según la reivindicación 9, en el que dicho anticuerpo monoclonal anti-CD40 humano comprende una región constante de la cadena pesada de la IgG1 humana.
- 25 11. Anticuerpo, uso o método según la reivindicación 10, en el que dicho anticuerpo monoclonal comprende la secuencia de aminoácidos relatada en la SEC ID NO:4 o en la SEQ ID Nº:5.
12. Anticuerpo, uso o método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo anti-CD40 se une al CD40 humano con una afinidad (K_D) de al menos aproximadamente 10^{-6} M, o al menos 10^{-8} M.
- 30 13. Anticuerpo, uso o método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo anti-CD40 se une al Fc γ RIIIa-158V humano con una afinidad (K_D) de al menos aproximadamente 0,5 μ M y/o se une al Fc γ RIIIa-158F humano con una afinidad (K_D) de al menos aproximadamente 12 μ M.
- 35 14. Anticuerpo, uso o procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo monoclonal es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal, en el que dicho fragmento conserva la capacidad de unirse específicamente a dicho antígeno CD40 humano.
15. Fragmento de unión a antígeno según la reivindicación 14, en el que dicho fragmento está seleccionado del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fv y un fragmento Fv monocatenario.
- 40 16. Anticuerpo o uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho uso da como resultado la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de las células que expresan CD40 por los linfocitos citolíticos naturales (NK) que expresan Fc γ RIIIa de un paciente humano.
- 45 17. Anticuerpo, uso o método según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que dicho anticuerpo anti-CD40 es más potente que el rituximab (Rituxan®) en un ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), en el que el ensayo comprende incubar células que expresan CD40 y células que expresan CD20 con linfocitos citolíticos naturales (NK) humanos aislados, en presencia del anticuerpo pertinente.
- 50 18. Anticuerpo, uso o método según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en el que dicho anticuerpo anti-CD40 es más potente que el rituximab (Rituxan®) en un modelo de lupus eritematoso sistémico (LES), esclerosis múltiple, inflamación y aterosclerosis, trasplante o enfermedad de Alzheimer.
- 55 19. Anticuerpo, uso o método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho paciente humano es resistente a un tratamiento para una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria.
20. Anticuerpo, uso o método según la reivindicación 19, en el que dicho paciente humano es resistente al tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-CD20.
- 60 21. Anticuerpo, uso o método según la reivindicación 20, en el que dicho anticuerpo monoclonal anti-CD20 es rituximab (Rituxan®).

Figura 1A
ADCC-029 (línea celular de linfoma de Daudi)

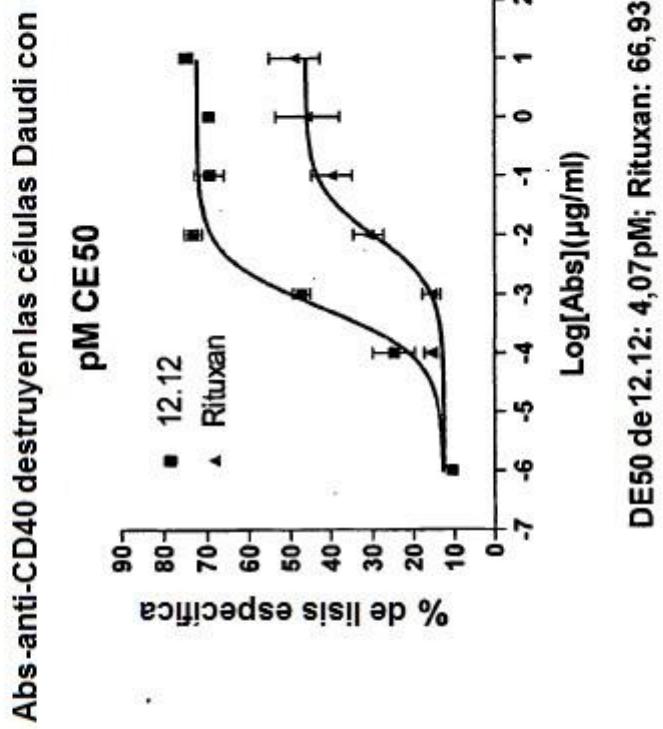
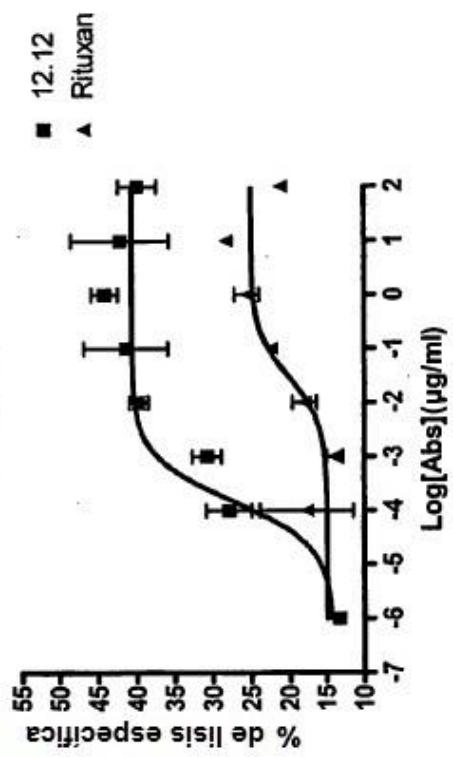


Figura 1B

ADCC-036 (línea celular de linfoma de Namalwa)
 Actividad destructora ADCC de Abs-anti-CD40 sobre las células Namalwa
 con pM CE 50



CE50 de 12.12: 1,01pM; Rituxan: 189,72pM

Figura 1C

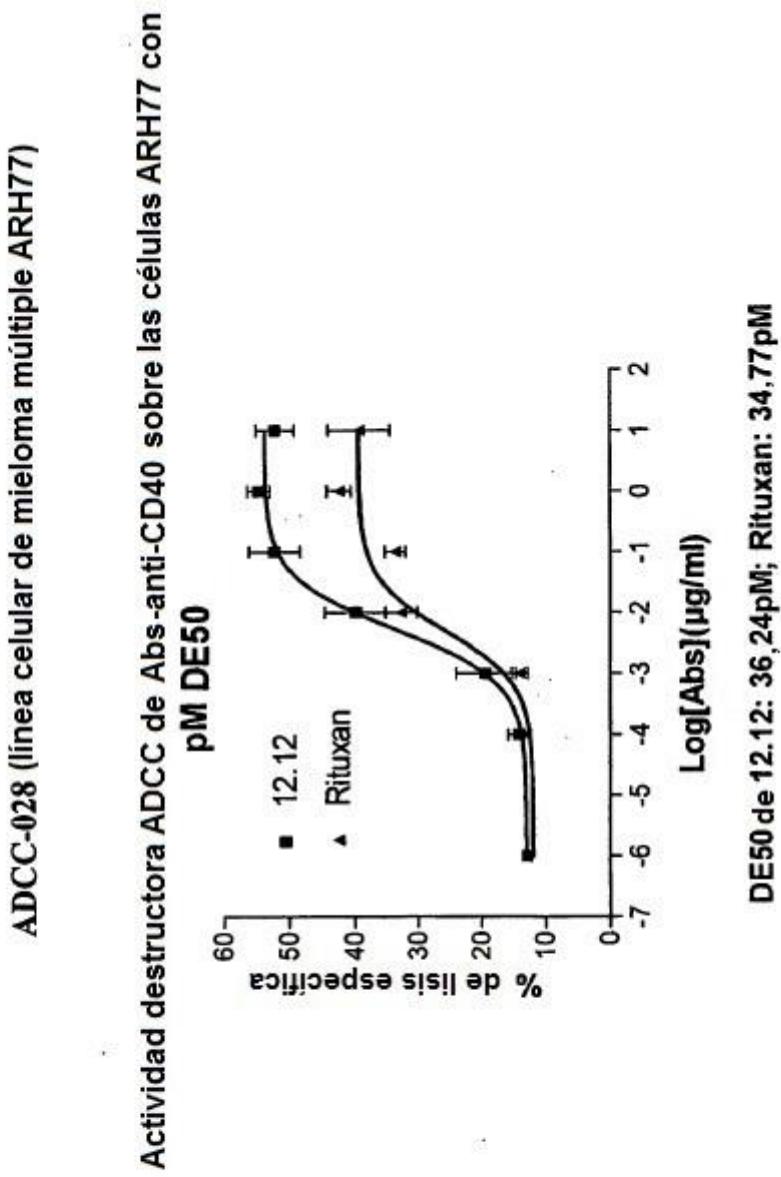
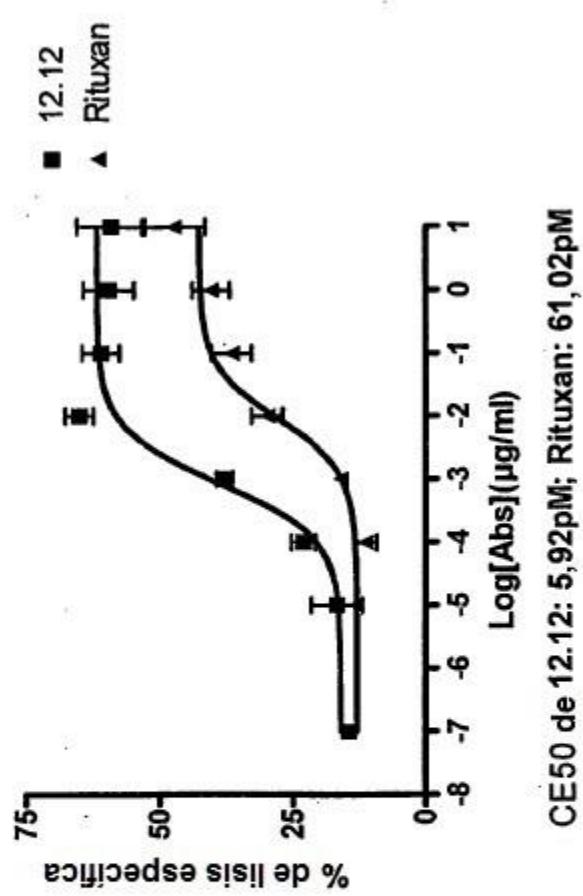


Figura 1D

ADCC-041 (línea celular de mieloma múltiple IM-9)

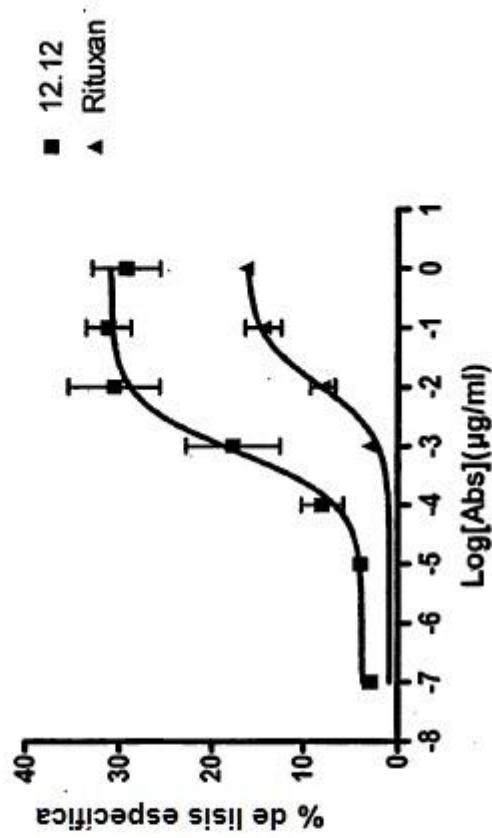
Actividad destructora ADCC sobre células IM-9 con pM CE50



CE50 de 12.12: 5,92pM; Rituksen: 61,02pM

Figura 1E

ADCC-056 (EHEB, línea celular B-CLL)
Actividad ADCC sobre células EHEB con pM CE50

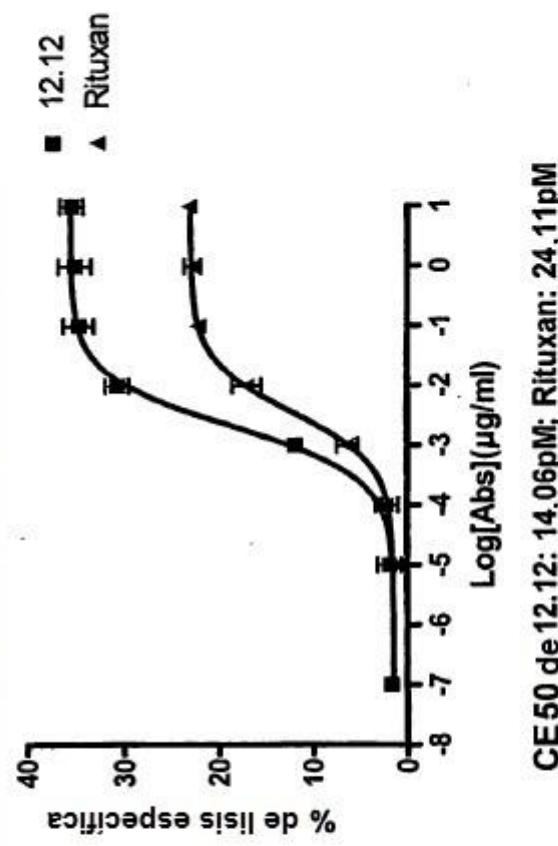


CE50 de 12.12: 5,56pM; Rituxan: 76,43pM

Figura 1F

ADCC-069 (CCRF-SB, línea celular B-ALL)

Actividad destructora ADCC sobre células CCRF-SB con pM CE50



CE 50 de 12.12: 14,06pM; Rituxan: 24,11pM

Figura 2A: CHIR-12.12 interviene en una ADCC mayor que rituximab contra células de pacientes de pacientes con LLC

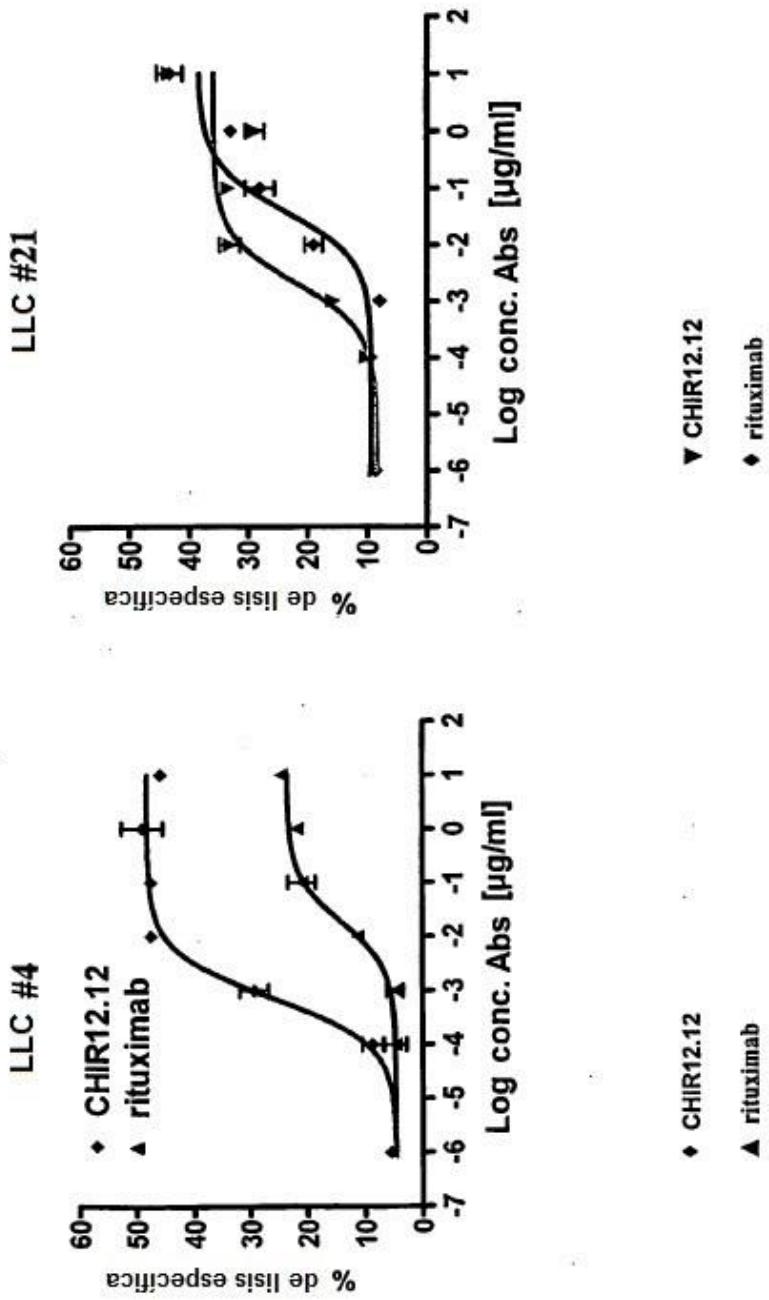


Figura 2B: CHIR-12.12 interviene en una ADCC mayor que rituximab contra células de pacientes con LLC

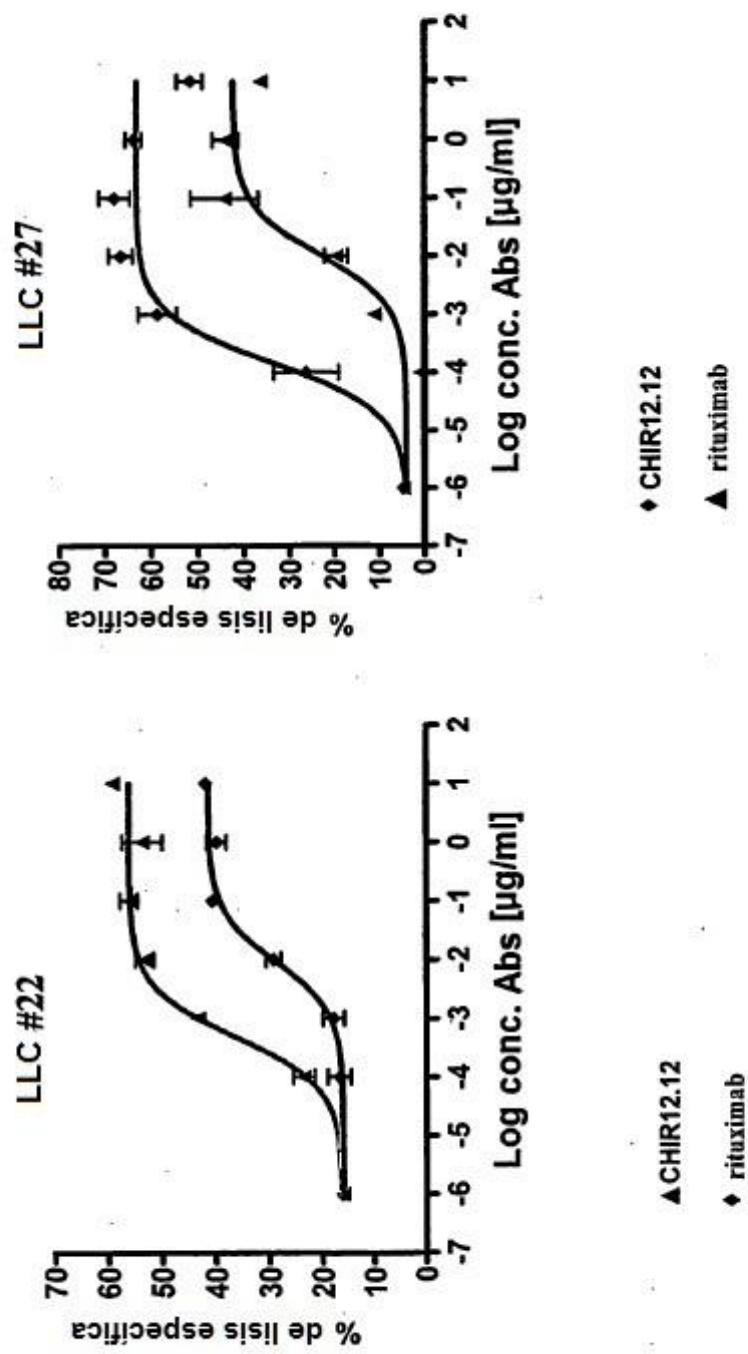


Figura 2C: CHIR-12.12 interviene en una ADCC mayor que rituximab contra células de pacientes con LLC

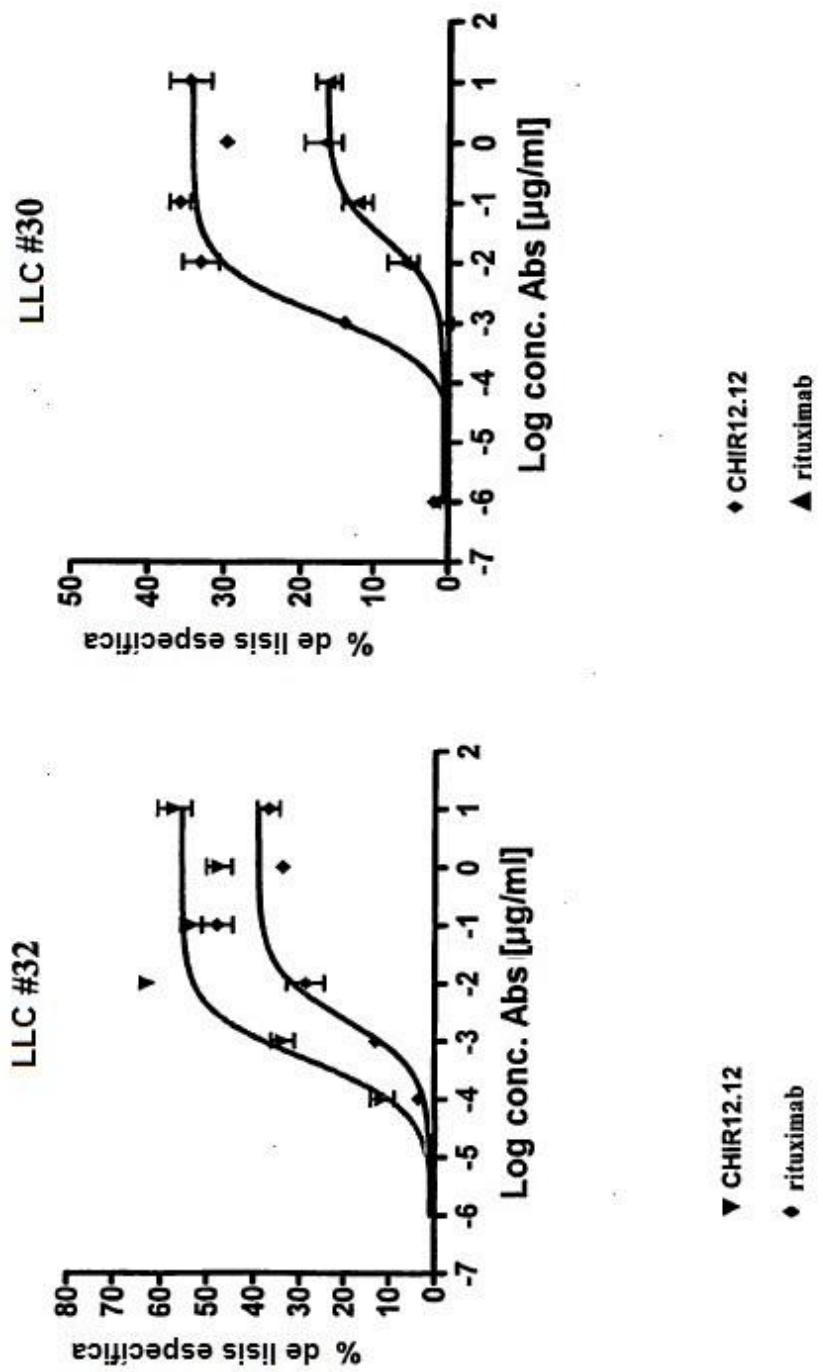


Figura 2D: CHIR-12.12 interviene en una ADCC mayor que rituximab contra células de pacientes con LLC

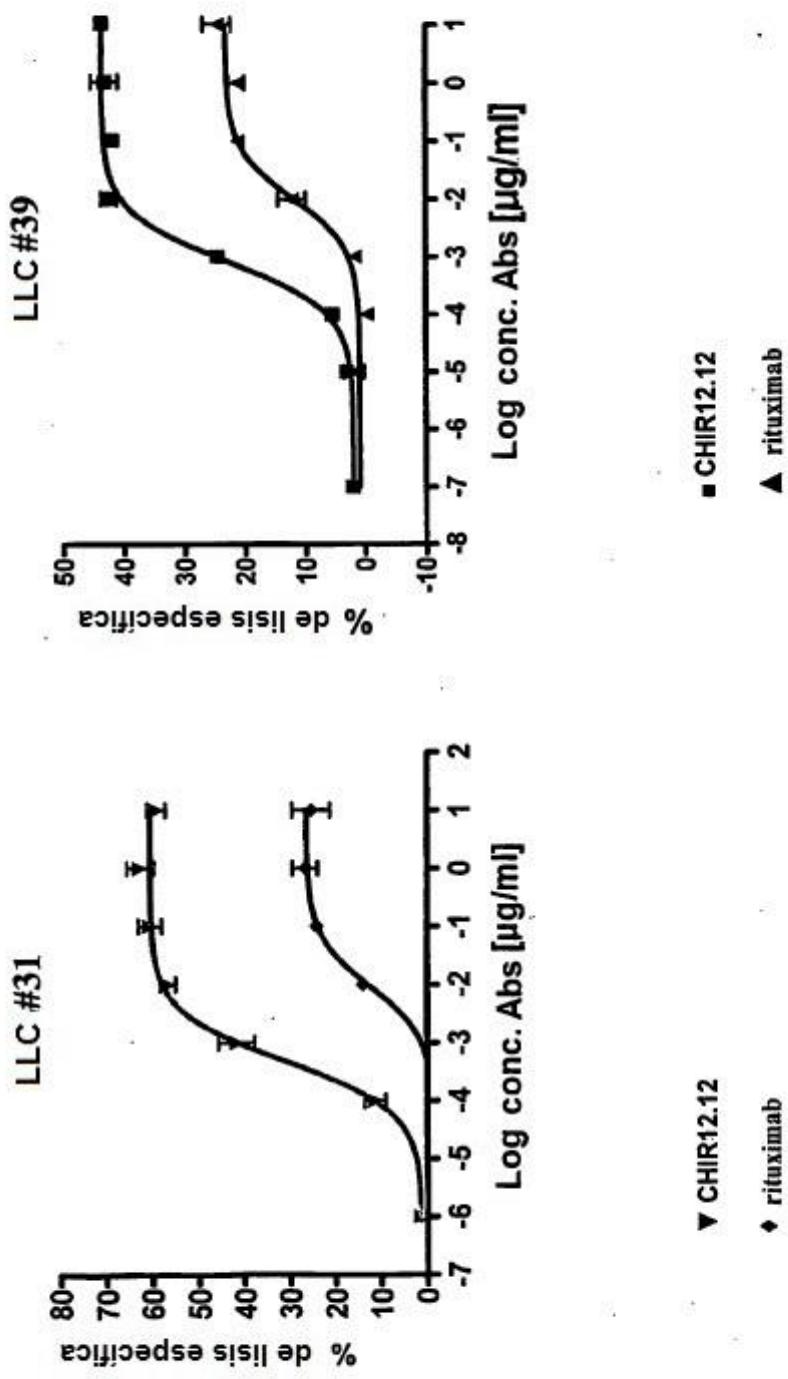


Figura 3: ADCC comparativa de CHIR-12.12 y rituximab contra células de pacientes con LLC (n=9) por linfocitos NK humanos de múltiples donantes

conc. Abs (µg/ml)	Fracción de lisis mediada por rituximab en comparación con CHIR-12.12	CHIR-12.12 CE50(pM)	Rituximab CE50(pM)
10	0,57 ± 0,18		
1	0,62 ± 0,24		
0,1	0,56 ± 0,21		
0,01	0,29 ± 0,14	13,25 ± 16,73	147,22 ± 135,6
0,001	0,14 ± 0,11		
0,0001	0,71 ± 2,18		
0,00001	-0,45 ± 0,49		

Figura 4: variación de donantes NK en las actividades ADCC en las mismas células diana (LLC#33)

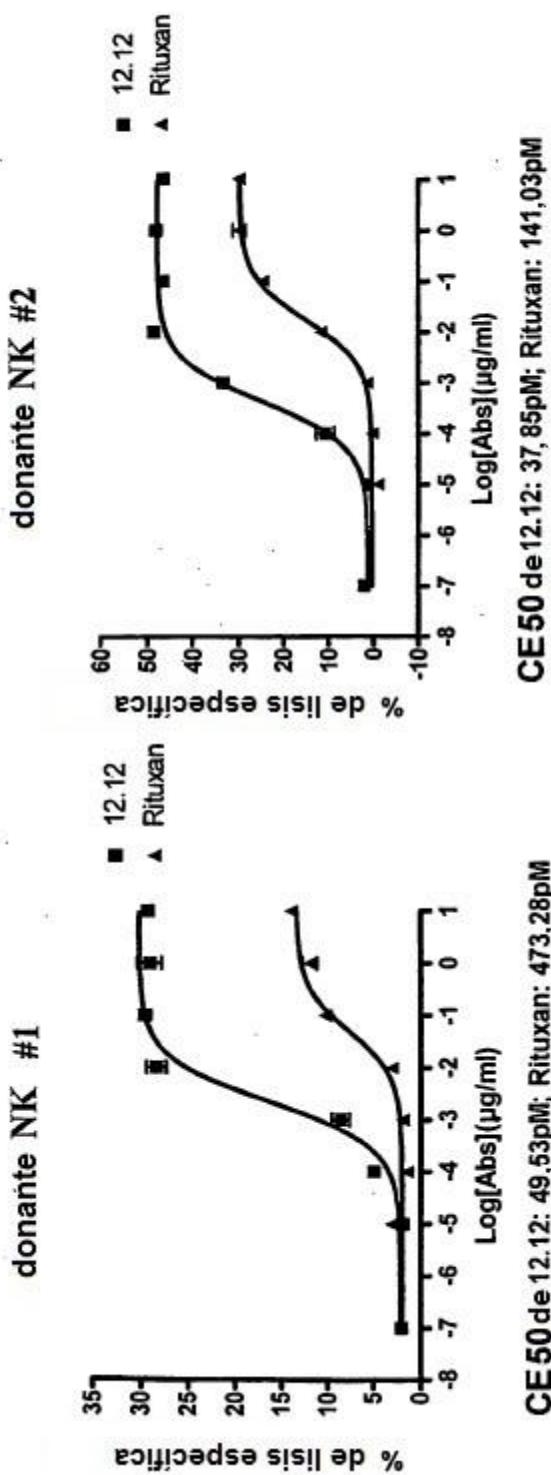


Figura 5: Cuantificación de moléculas CD40 y CD20 expresadas en células de pacientes con LLC y linfocitos B normales

paciente con LLC #	CHIR-12.12	Rituximab
	moléculas CD40	moléculas CD20
30	684 ± 8	9584 ± 44
31	1590 ± 79	6838 ± 135
27	1158 ± 57	1455 ± 126
32	2860 ± 38	28494 ± 547
33	1421 ± 201	5799 ± 160
linfocitos B humanos (n=2)	4067 ± 438	68358 ± 22830

Figura 6: Expresión relativa de moléculas CD40 y CD20 en células de pacientes con LLC y actividad ADCC

paciente con LLC #	% de lisis máxima			Relación de moléculas diana CD20/CD40
	CHIR-12.12	Rituximab	Diferencia entre CHIR-12.12 y Rituximab	
4	46,35	20,15	26,2	N/A
21	32,9	32,8	0,1	N/A
22	46,65	31,08	15,57	N/A
27	79,87	56,04	23,83	1,26
32	56,92	49,97	6,95	9,96
30	37,6	21,33	16,27	14,01
31	63,4	27,27	36,13	4,3
33(1)	27,71	12,33	15,38	
33(2)	48,57	28,63	19,94	4,08
39	44,18	21,13	23,05	N/A
Promedio DE	48,42 15,27	30,07 13,57		

Figura 7: Niveles de CHIR-12.12 unido a la superficie celular (medidos como intensidad de fluorescencia) después de 3 horas de incubación a 4°C y a 37°C

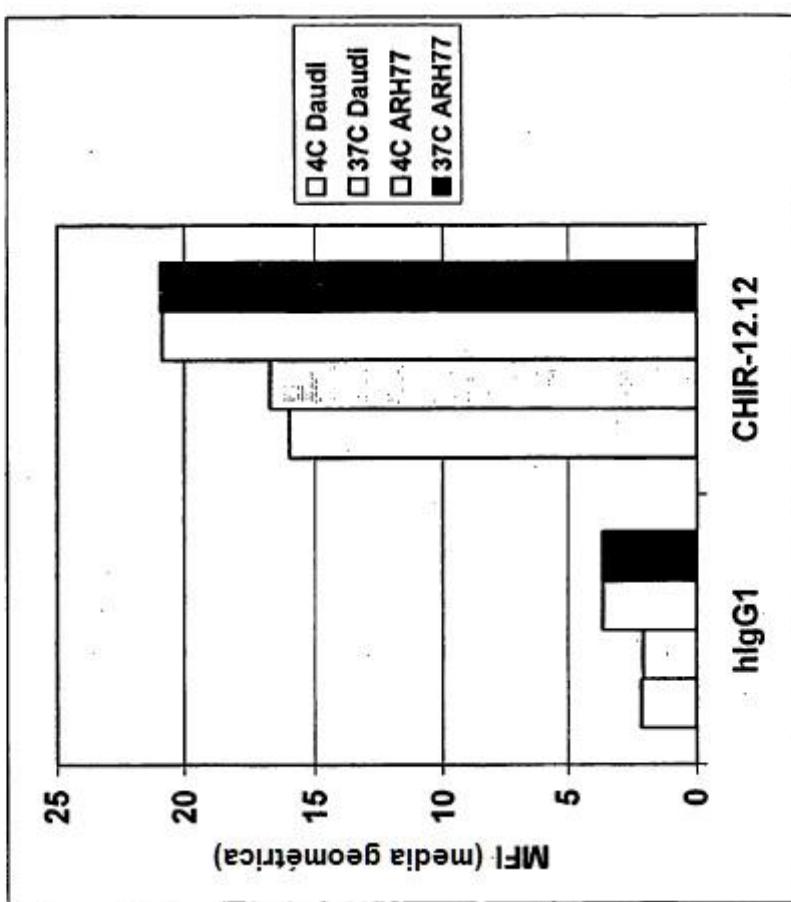
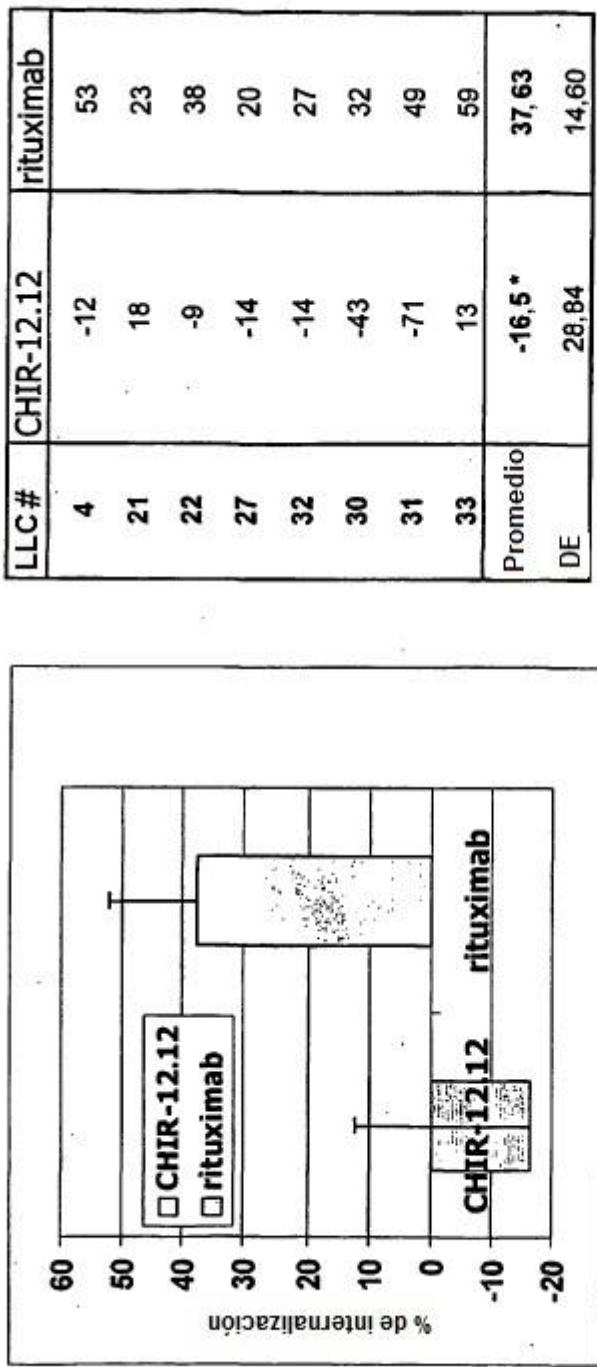


Figura 8: Porcentaje de internalización de CHIR-12.12 y rituximab en células de pacientes con LLC (n=8): FACS



% de internalización = $100 \times \{(\text{GMF de Abs de ensayo a } 4^{\circ}\text{C}-\text{GMF de Abs isotipo a } 4^{\circ}\text{C}) - (\text{GMF de Abs de ensayo a } 37^{\circ}\text{C} - \text{GMF de Abs isotipo a } 37^{\circ}\text{C})\} / (\text{GMF de Abs de ensayo a } 4^{\circ}\text{C}-\text{GMF de Abs isotipo a } 4^{\circ}\text{C})$

GMF: Media geométrica de la intensidad de fluorescencia

* un % de internalización negativo indica una mayor unión de CHIR-12.12 a 37°C en comparación con 4°C

Figura 9: Internalización de CHIR-12.12 y rituximab en linfocitos B normales: microscopio confocal

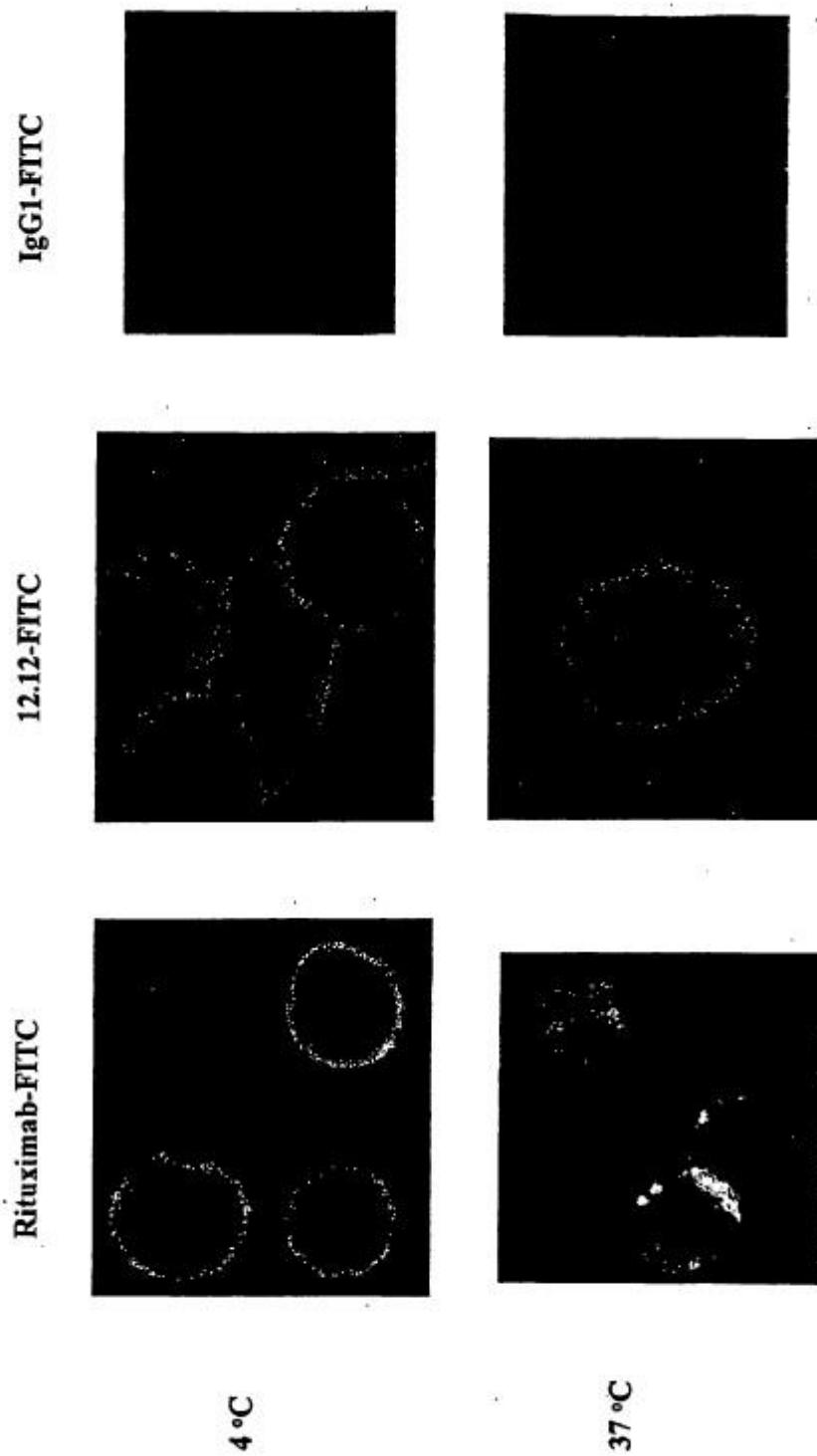


Figura 10: Internalización de CHIR-12.12 y rituximab en células de pacientes LLC#33: microscopio confocal

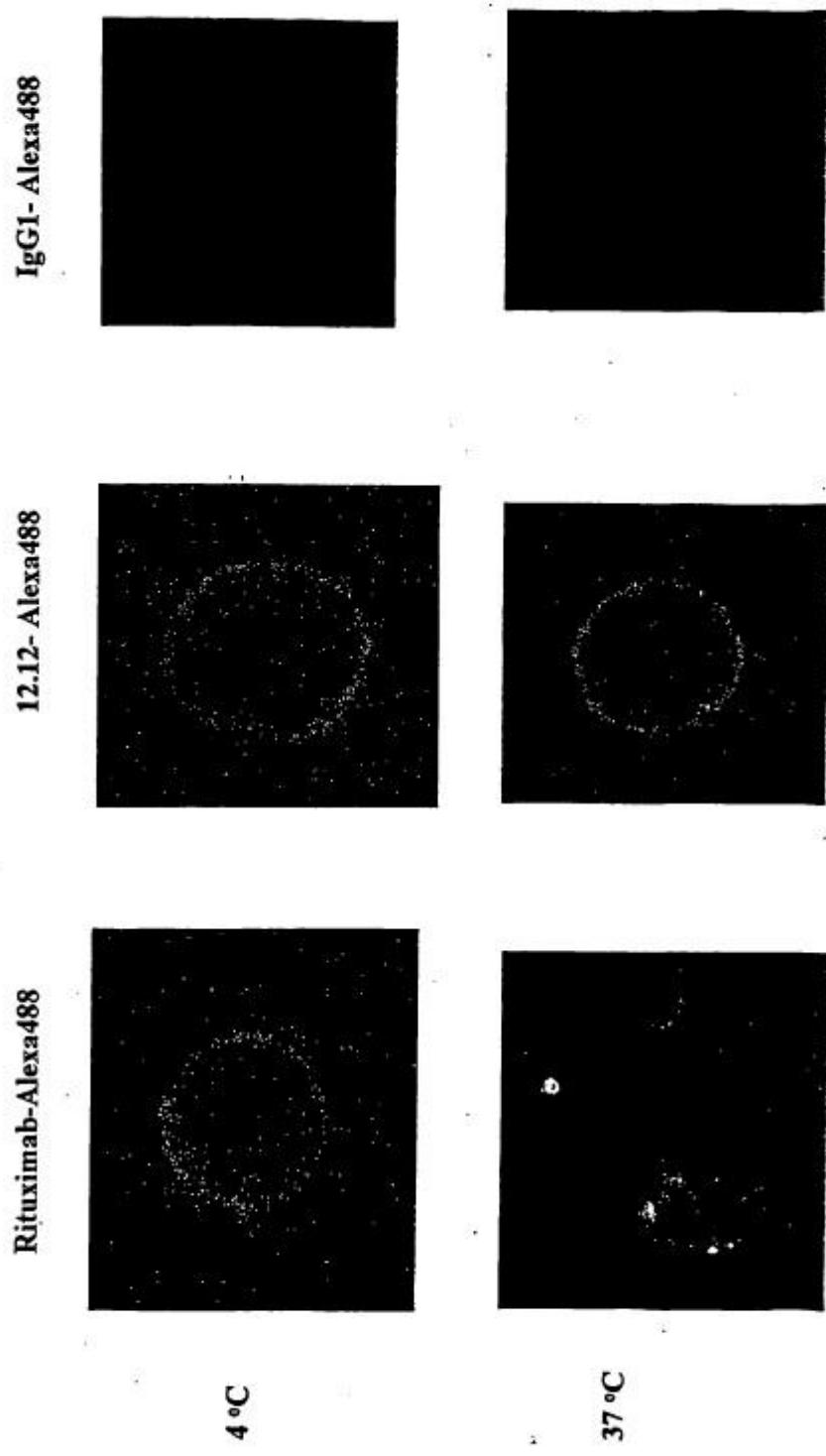


Figura 11: Relación entre actividad ADCC e internalización

paciente con LLC #	% de lisis máxima			% de internalización		
	CHIR-12.12	Rituximab	Diferencia entre CHIR-12.12 y Rituximab	CHIR-12.12	Rituximab	
4	46,35	20,15	26,2	No	53	
21	32,9	32,8	0,1	18	23	
22	46,65	31,08	15,57	No	38	
27	79,87	56,04	23,83	No	20	
32	56,92	49,97	6,95	No	27	
30	37,6	21,33	16,27	No	32	
31	63,4	27,27	36,13	No	49	
33(1)	27,71	12,33	15,38			
33(2)	48,57	28,63	19,94	13	59	
39	44,18	21,13	23,05	N/A	N/A	

Figura 12

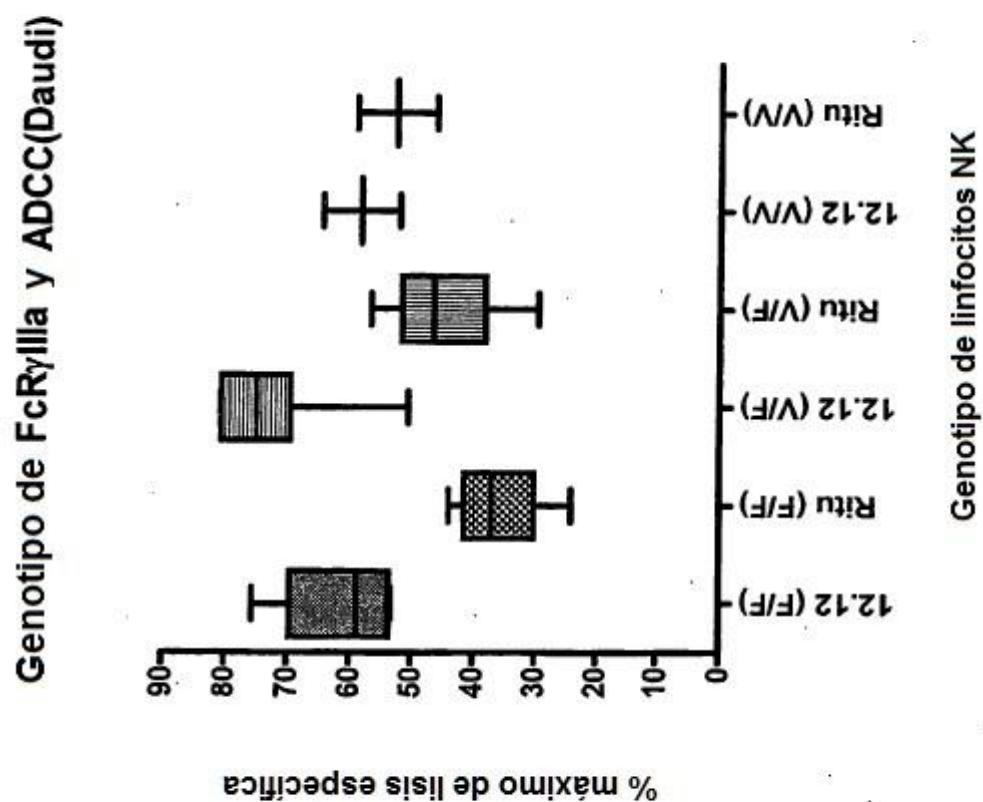


Figura 13

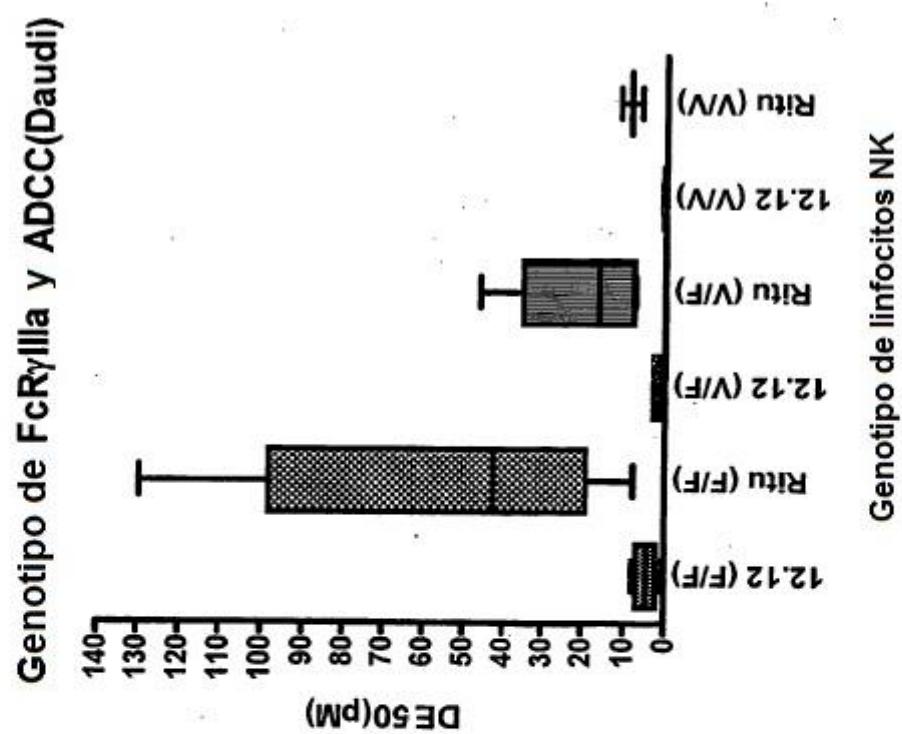


Figura 14: ADCC comparativa de CHIR-12.12 y rituximab contra células de pacientes con LLC ($n=9$) por linfocitos NK humanos de múltiples donantes con genotipo de Fc γ IIIa variante.

paciente con LLC#	% de lisis máxima			CE50(pM)		Genotipo de Fc γ IIIa de donante NK
	CHIR-12.12	Rituximab	Diferencia entre CHIR-12.12 y Rituximab	CHIR-12.12	Rituximab	
4	46,35	20,15	26,2	5,12	127,64	25 FF
21	32,9	32,8	0,1	14,86	272,68	18 FF
22	46,65	31,08	15,57	3,24	62,08	19 FF
27	79,87	56,04	23,83	0,99	71,54	72 VF
32	56,92	49,97	6,95	3,14	16,58	5 VP
30	37,6	21,33	16,27	8,87	170,34	19 VV
31	63,4	27,27	36,13	3,23	64,59	20 VV
33(1)	27,71	12,33	15,38	49,53	473,28	10 FF
33(2)	48,57	28,63	19,94	37,85	141,03	4 VV
39	44,18	21,13	23,05	5,63	72,42	13 VF
Media	48,42	30,07	18,34	13,25	147,22	20,53
DE	15,27	13,57	10,09	16,73	135,60	19,43