



No. 06-054042- -00011-0000

Fecha: 2012-05-09 15:25:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 265

Clarke, Modet & C

COLOMBIA

P-789

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Por: TRUOP. CAMISIAN
TASA DE \$ 120.000 =
Y ALEGRIA A MARIKIA
DIVISION - FASEN Y TASA
DE \$ 450.000 = CUCIAS

Re: Expediente No. 06.054.042

Solicitud de patente a nombre de **CHIRON CORPORATION**.

Yo, DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la carrera 11 A No. 86-53, piso 6, obrando como apoderada de la sociedad **CHIRON CORPORATION** domiciliada en Emeryville, Estados Unidos, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. 12 notificado por fijación en lista el 5 de enero de 2012, nos permitimos manifestar lo siguiente:

1. SOLICITUD DE DIVISIONAL No. 06.054.042A

Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 36 de la Decisión 486 al solicitante para dividir en dos o más solicitudes fraccionarias, en cualquier momento del trámite, me permito presentar:

1.1 La patente divisional titulada "ANTICUERPOS ANTAGONISTAS ANTI-CD40 MONOCLONALES Y MÉTODOS PARA SU USO" cuya memoria descriptiva corresponde a la misma de la solicitud como fue originalmente presentada y con nuevo capítulo reivindicatorio que consta de 25 reivindicaciones donde se excluyó la materia específica reivindicada en la solicitud parental.

Para este efecto acompañamos la siguiente documentación:

000001

a) La solicitud y el capítulo reivindicatorio correspondientes, junto con la memoria descriptiva que explica, ilustra y sustenta las reivindicaciones y que se encuentra en el expediente No. **No. 06.054.042A**.

b) Recibo de pago correspondiente al valor de la tasa oficial por concepto de la presentación de la solicitud divisional y la obtención de los respectivos certificados y recibo de pago por 15 reivindicaciones adicionales.

c) Igualmente, solicito a ese despacho tener en cuenta el poder y cesión de los folios 461 a 468.

1.2 Teniendo en cuenta lo establecido en el artículo 36 de la Decisión 486, ruego a ese despacho tener en cuenta que la solicitud divisional que ahora presento, se beneficia de la fecha de presentación de la prioridad de la solicitud inicial, es decir, de la prioridad 60/517,337; 60/525,579 y 60/565,710 de noviembre 4 de 2003, Noviembre 26 de 2003 y abril 27 de 2004, respectivamente.

1.3 Finalmente, me permito aclarar que la solicitud divisional no involucra ampliación alguna de la divulgación contenida en la solicitud inicial.

2. SOLICITUD ORIGINAL No. 06.054.042

2.1 Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto con este memorial nuevo capítulo reivindicatorio que consta de 17 reivindicaciones, el cual se encuentra basado en aquel presentado el 15 de noviembre de 2011.

En este sentido, la señora examinadora podrá corroborar que la reivindicación 1 fue modificada a fin de especificar un anticuerpo monoclonal humano anti-CD40 que comprende por lo menos un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada del anticuerpo CHIR12.12 (véase por favor la parte (a) de la nueva reivindicación 1) o un anticuerpo monoclonal humano que comprende al menos un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada del anticuerpo CHIR-5.9 (véase por favor la parte (b) de la nueva reivindicación 1), cuyo sustento se encuentra en la memoria

descriptiva y en la antigua reivindicación 4. Parte (ix) y en la reivindicación original 5 parte (ix).

La antigua reivindicación 2 permanece como la nueva cláusula 2 y se corrigió un error involuntario en el preámbulo de la misma de tal suerte que se indique ahora que es “*un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1*” en lugar de “*el fragmento de unión*”.

La antigua reivindicación 3 se canceló.

En cuanto a la antigua cláusula 4, ahora re-enumerada como la nueva reivindicación 3, nos permitimos decir que la misma se modificó de tal forma que el anticuerpo monoclonal humano anti-CD40 comprende:

- i. El dominio variable y la región constante de la cadena ligera del anticuerpo CHIR-12.12, esto es, los residuos 21-239 de la SEQ ID No. 2 y el dominio variable y la región constante de la cadena pesada del anticuerpo CHIR12.12, esto es, los residuos 20-469 de la SEQ ID No. 4;
- ii. El dominio variable y la región constante de la cadena ligera del anticuerpo CHIR-12.12, es decir, los residuos 21-239 de la SEQ ID No. 2 y el dominio variable y la región constante alternativa de la cadena pesada del anticuerpo CHI12.12, es decir, los residuos 20-469 de la SEQ ID No. 5;
- iii. La cadena ligera completa (SEQ ID No. 2) y la cadena pesada completa (SEQ ID No. 4) del anticuerpo CHIR-12.12; y
- iv. La cadena ligera completa (SEQ ID No. 2) y la cadena pesada completa del anticuerpo CHIR-12.12, en donde la cadena pesada comprende la región constante alternativa (SEQ ID No. 5).

El sustento para estas modificaciones se encuentra en las partes (x) a (xiii) de la antigua reivindicación 4.

La antigua cláusula 5 que ahora corresponde a la nueva reivindicación 4 se modificó de manera similar a la anterior reivindicación 4, pero con relación

al anticuerpo CHIR-5.9. Por lo tanto, la nueva reivindicación 4 ahora se encuentra dirigida al anticuerpo monoclonal que comprende:

- i. El dominio variable y la región constante de la cadena ligera del anticuerpo CHIR-5.9, esto es, los residuos 21-239 de la SEQ ID No. 6 y el dominio variable y la región constante de la cadena pesada del anticuerpo CHIR-5.9, esto es, los residuos 20-474 de la SEQ ID No. 7;
- ii. El dominio variable y la región constante de la cadena ligera del anticuerpo CHIR-5.9, es decir, los residuos 21-239 de la SEQ ID No. 6 y el dominio variable y la región constante alternativa de la cadena pesada del anticuerpo CHI-5.9, es decir, los residuos 20-474 de la SEQ ID No. 8;
- iii. La cadena ligera completa (SEQ ID No. 6) y la cadena pesada completa (SEQ ID No. 7) del anticuerpo CHIR-5.9; y
- iv. La cadena ligera completa (SEQ ID No. 6) y la cadena pesada completa del anticuerpo CHIR-5.9, en donde la cadena pesada comprende la región constante alternativa (SEQ ID No. 8).

El sustento para estas modificaciones se encuentran en las partes (x) –(xiii) de la antigua cláusula 5.

Las antiguas reivindicaciones 6 y 7 se re-enumeraron como las nuevas cláusulas 5 y 6, respectivamente y la dependencia de la reivindicación 6 se ajustó de conformidad.

Las antiguas reivindicaciones 8 y 9 se combinaron en una sola reivindicación la cual es la nueva reivindicación 7.

Las cláusulas 10 y 11 se re-enumeraron como las nuevas reivindicaciones 8 y 9, respectivamente. En vista de las anteriores modificaciones, la nueva cláusula 9 se modificó para hacerla dependiente únicamente de aquellas reivindicaciones que protegen específicamente las estructuras del polipéptido.

La reivindicación 12 se re-enumeró como la nueva cláusula 10. Esta reivindicación se modificó con el ánimo de que indique que la línea celular de hibridoma “produce” el anticuerpo reclamado y se hizo dependiente únicamente de las reivindicaciones 1 a 4, cada una de las cuales recita un anticuerpo que tiene una estructura específica con secuencias de polipeptidos conocidas presentes dentro de esa estructura.

Las reivindicaciones de método in vitro se cancelaron a fin de agilizar la concesión de la presente invención.

La composición farmacéutica de las antiguas reivindicaciones 19, 20 y 25 se combinaron en una sola reivindicación ahora nueva reivindicación 11. Esta cláusula se modificó con el fin de definir la composición farmacéutica para ser una formulación farmacéutica líquida que tiene un pH específico, es decir, dentro de un rango de 5.0 a 7.0 y que comprende un amortiguador específico a una concentración de 1 mM a 50 mM. El sustento para esta reivindicación se encuentra en las antiguas reivindicaciones 19, 20 y 25 como también en la memoria descriptiva, principalmente desde la página 110 hasta la página 114.

De otra parte, las antiguas reivindicaciones 21 y 22 se combinaron en una sola cláusula (nueva reivindicación 12) y las antiguas 23, 24 y 26 se reenumeraron como las nuevas reivindicaciones 13, 14 y 15 respectivamente y se modificó su dependencia.

La antigua cláusula 27 (ahora la nueva reivindicación 16) se modificó con el ánimo de incluir el polisorbato 80 ó polisorbato 20 cuando está presente el tensoactivo dentro de la composición.

En vista de las anteriores modificaciones y de la cuestión indicada por la señora examinadora en cuanto a la relación que existe entre las SEQ ID No. 4 y 5 y entre las SEQ ID No 7 y 8, el solicitante atentamente se permite presentar junto con este escrito un resumen de la información de secuencias para los anticuerpos CHIR 12-12 y CHIR-5.9 (véase por favor apéndice 3), también se permite adjuntar un alineamiento de secuencias para las

000005

secuencias ID 4 y 5 (véase por favor apéndice 4) y un alineamiento de secuencias para SEQ ID No. 7 y 8 (véase por favor apéndice 5).

2.2 Claridad de la solicitud

La antigua reivindicación 1 fue objetada en su claridad dado que el anticuerpo reclamado no se encontraba descrito por sus características estructurales y más aun, porque el anticuerpo estaba definido por su unión a un epítopo. En este sentido y de acuerdo con las ambles sugerencias de la señora examinadora, la nueva reivindicación 1 se modificó para eliminar la referencia a las antiguas partes (a) a (d) e incluir la referencia a la parte (ix) de la antigua reivindicación 4 y a la parte (ix) de la antigua reivindicación 5.

Así las cosas, la nueva reivindicación 1 ahora se encuentra dirigida a un anticuerpo monoclonal humano anti-CD40 que comprende por lo menos un el dominio variable de cadena ligera y el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo CHIR-12.12 (véase por favor la parte (a) de la reivindicación 1 y también la carta en el apéndice 39 ó un anticuerpo monoclonal humano anti-CD40 que comprende al menos un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada del anticuerpo CHI-5.9 (véase por favor la parte (b) de la nueva reivindicación 1 que ha sido enmendada con el fin de indicar explícitamente “dominio variable de cadena ligera” y “dominio variable de cadena pesada” para aclarar que el anticuerpo reclamado contiene estas regiones estructurales de los anticuerpos CHI-12.12 y CHIR-5.9. Por lo que amablemente, solicitamos que sean retiradas las objeciones de claridad en este sentido.

En relación con la reivindicación 2, nos permitimos decir que con la enmienda para cambiar el término erróneo “fragmento de unión” por el término correcto “anticuerpo monoclonal”, queda cabalmente superada dicha objeción.

De otra parte, con la cancelación de la reivindicación 3 se supera la objeción planteada por la señora examinadora en este sentido.

000006

En cuanto a la reivindicación 4 antigua, esta, que ahora es la número 3, se modificó con el fin de retirar las referencias a las partes (i)-(ix). Como se anotó anteriormente, la parte (ix) de esta reivindicación se incorporó en la nueva reivindicación 1. Las partes (x)-(xiii) de esta reivindicación fueron reenumeradas como las partes (i)-(iv), respectivamente.

En este sentido, atentamente nos permitimos decir que la nueva reivindicación 3 se encuentra dirigida al anticuerpo monoclonal humano antiCD-40 que comprende las regiones variable y constante de la cadena ligera del anticuerpo CHIR-12.12 y las regiones variable y constante (o constante alternativa) de la cadena pesada del anticuerpo CHIR-12.12 (véase por favor la información secuencia en apéndice 3).

De otra parte, en relación con la homología entre las SEQ ID 5 ó SEQ ID No. 8 con las SEQ ID No. 4 ó SEQ ID No. 7, el solicitante manifiesta que el alineamiento de secuencias entre SEQ ID No. 4 (la cual expone la cadena pesada completa del anticuerpo CHIR-12.12) y la SEQ ID No. 5 (la cual expone la cadena pesada variante del anticuerpo CHIR-12.12) se adjunta como el apéndice 4. Como se puede observar en dicho alineamiento, la SEQ ID No. 4 y la SEQ ID No. 5 comparten el 99.8% de identidad de la secuencia y difieren tan sólo en un aminoácido. La descripción enseña que la diferencia en ese sólo aminoácido entre la SEQ ID No. 4 y la SEQ ID No. 5 es el resultado de una sustitución que sucede dentro de la región constante de la cadena pesada del CHIR-12.12, en donde el residuo de serina es substituido por el residuo de alanina en la posición 153 de la SEQ ID No. 4. Véase por favor la figura 9 y la descripción de la figura 9 en la presente memoria descriptiva entre las páginas 11 y 12 y también en la información de secuencia resumida en el apéndice 3.

Así mismo, el alineamiento de secuencia entre SEQ ID No. 7 el cual expone la cadena pesada completa del anticuerpo CHIR-5.9) y la SEQ ID No. 8 (la cual expone la variante de cadena pesada del anticuerpo CHIR-5.9) se adjunta como el apéndice 5. Como se puede observar en dicho alineamiento, la SEQ ID No. 7 y la SEQ ID No. 8 también comparten el 99.8% de identidad de secuencia y difieren tan sólo en un aminoácido. La descripción enseña que la diferencia en ese sólo aminoácido entre la SEQ

000007

ID No. 7 y la SEQ ID No. 8 es el resultado de una sustitución que sucede dentro de la **región constante** de la cadena pesada del CHIR-5.9, en donde el residuo de serina es substituido por el residuo de alanina en la posición 158 de la SEQ ID No. 7. Véase por favor la figura 11 y la descripción de la figura 11 en la presente memoria descriptiva entre la página 12 y también en la información de secuencia resumida en el apéndice 3.

Respecto a la antigua reivindicación 8 que fue objetada por ser considerada como un resultado a ser alcanzado, nos permitimos decir que con su combinación con la antigua reivindicación 9, queda superada esta objeción.

En cuanto a la antigua reivindicación 11 que había sido objetada por claridad dado que la molécula de ácido nucleico no se definía por su secuencia, nos permitimos decir que la misma reivindicación que ahora corresponde a la nueva cláusula 9, se modificó de tal modo que su dependencia es específica a las estructuras de polipéptidos para los anticuerpos anti-CD40 reclamados y la persona versada en la materia técnica correspondiente fácilmente evidenciará las moléculas de ácido nucleico que codifican una secuencia de polipéptido conocida, dado que los condones para cada aminoácido conocido se encuentran fijados por el código genético. Así las cosas, el solicitante, atentamente, manifiesta que dicha reivindicación es ahora clara.

En relación con las reivindicaciones de composición farmacéutica, nos permitimos decir que con las inclusiones arriba descritas, la composición ahora es totalmente clara.

2.3 Excepciones a la Patentabilidad.

En este sentido, nos permitimos decir que con la cancelación de las antiguas reivindicaciones 13 a 17 queda cabalmente superada esta objeción.

2.4 Determinación del estado de la Técnica

El señor examinador ha confirmado que la búsqueda para las secuencias de SEQ ID No. 2 y 4 (secuencias completas de cadena ligera y cadena pesada para el anticuerpo CHIR-12.12) y la SEQ ID No. 6 y 7 (secuencias

completas de cadena ligera y pesada del anticuerpo CHIR-5.9) reportó que estas secuencias se encuentran fuera de la técnica anterior. Como se explicó anteriormente, la SEQ ID No. 4 comparte el 99.8% de identidad de secuencia con su variante de cadena pesada establecida en la SEQ ID 5. Del mismo modo, la SEQ ID No. 7 comparte el 99.8% de identidad de secuencia con su variante de cadena pesada establecida en la SEQ ID No. 5 y por lo tanto, una persona versada en la materia técnica correspondiente entenderá fácilmente que una sola substitución de aminoácido dentro de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo CHIR-12.12 ó dentro de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo CHIR-5.9 no requeriría de una búsqueda adicional para la SEQ ID No. 5 y SEQ ID No. 7. En este sentido, el solicitante se permite agradecer a la señora examinadora considerar los anticuerpos reclamados en una sola solicitud de patente.

En consecuencia, de manera atenta solicitamos a ese despacho conceder el privilegio de patente de invención para la solicitud en estudio o si es el caso, solicitamos a ese despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional. De igual forma, si el examinador considera que subsisten razones para objetar la presente invención ruego expedir otro examen de fondo con los debidos motivos y razones que sustenten su objeción con el fin de que mi mandante tenga la posibilidad de exponer sus argumentos con base en la interpretación de los artículos 45 de la Decisión 486 -el cual otorga la facultad al examinador para emitir los exámenes de fondo-, 35 y 59 del Código Contencioso Administrativo que señala que: *“habiéndose dado oportunidad a los interesados para expresar sus opiniones, y con base en las pruebas e informes disponibles, se tomará la decisión que será motivada al menos en forma sumaria si afecta a particulares”* y *“(.) deberá proferirse la decisión definitiva. Esta se motivará en sus aspectos de hecho y de derecho, y en los de conveniencia si es el caso”,* respectivamente (El subrayado es nuestro).

Señor Superintendente,


 DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN
 C.C. 41.654.882 de Bogotá
 T.P. 20824 del C.S.J.
 mc

000000

APÉNDICE 3

INFORMACIÓN DE SECUENCIA

APPENDIX 3

Sequence information: See Figures 9A and 9B (CHIR-12.12) and 11A and 11B (CHIR-5.9) and respective figure legends at page 6, line 29, continuing through page 7, line 7, and at page 7, lines 10-19; and the specification at page 18, lines 5-26.

Antibody	Chain	Leader (residues)	Variable Domain (residues)	Constant Region (residues)	Variable + Constant (residues)
CHIR-12.12	Light SEQ ID NO:2	1-20	21-132	133-239	21-239
	Heavy SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:5 (single aa variant in constant domain)	1-19 (identical for SEQ ID NO:4 and 5)	20-139 (identical for SEQ ID NO:4 and 5)	140-469 (residue 153 is Ala in SEQ ID NO:4, Ser in SEQ ID NO:5)	20-469 (residue 153 is Ala in SEQ ID NO:4, Ser in SEQ ID NO:5)
CHIR-5.9	Light SEQ ID NO:6	1-20	21-132	133-239	21-239
	Heavy SEQ ID NO:7 or SEQ ID NO:8 (single aa variant in constant domain)	1-19 (identical for SEQ ID NO:7 and 8)	20-144 (identical for SEQ ID NO:7 and 8)	145-474 (residue 158 is Ala in SEQ ID NO:7, Ser in SEQ ID NO:8)	20-474 (residue 158 is Ala in SEQ ID NO:7, Ser in SEQ ID NO:8)

*SEQ ID NO:5 sets forth the heavy chain variant of the CHIR-12.12 antibody, which differs from the heavy chain of SEQ ID NO:4 by a single amino acid substitution within the constant region of the heavy chain, wherein a serine residue is substituted for the alanine residue at position 153 of SEQ ID NO:4. See the present specification at page 18, lines 11-14.

*SEQ ID NO:8 sets forth the heavy chain variant of the CHIR-5.9 antibody, which differs from the heavy chain of SEQ ID NO:7 by a single amino acid substitution within the constant region of the heavy chain, wherein a serine residue is substituted for the alanine residue at position 158 of SEQ ID NO:7. See the present specification at page 18, lines 21-24.

APÉNDICE 4

ALINEAMIENTO GLOBAL DE LA SEQ ID No. 4 versus SEQ ID No. 5

Readseq version 2.1.30 (12-May-2010) Readseq version 2.1.30 (12-May-2010)

 lalign output for SEQ ID NO:4 vs. SEQ ID NO:5

[ISREC-Server] Date: Tue Apr 3 21:21:51 2012

```
./wwwtmp/.29205.1.seq : 469 aa

ALIGN calculates a global alignment of two sequences
version 2.2u
Please cite: Myers and Miller, CABIOS (1989) 4:11-17
SEQ ID NO:4 469 bp                               469 aa vs.
SEQ ID NO:5 469 bp                               469 aa
using matrix file: BLOSUM50, gap open/ext: -14/-4
99.8% identity in 469 aa overlap;                Global score: 3182

      10      20      30      40      50      60
SEQ ID MEFGLSWVFLVAILRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGPTFSSYGMHWVRQAP
      .....
SEQ    MEFGLSWVFLVAILRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGPTFSSYGMHWVRQAP
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90     100     110     120
SEQ ID GKGLEWVAVISYEESNRYHADSVKGRFTISRDN SKITLYLQMNSLRTEDTAVYYCARDGG
      .....
SEQ    GKGLEWVAVISYEESNRYHADSVKGRFTISRDN SKITLYLQMNSLRTEDTAVYYCARDGG
      70      80      90     100     110     120

      130     140     150     160     170     180
SEQ ID IAAPGPDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPASKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
      .....
SEQ    IAAPGPDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
      130     140     150     160     170     180

      190     200     210     220     230     240
SEQ ID NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEK
      .....
SEQ    NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEK
      190     200     210     220     230     240

      250     260     270     280     290     300
SEQ ID SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
      .....
SEQ    SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
      250     260     270     280     290     300

      310     320     330     340     350     360
SEQ ID VDGEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
      .....
SEQ    VDGEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
      310     320     330     340     350     360

      370     380     390     400     410     420
```

```
SEQ ID AKGQPREPQVYTLPPSREENTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
      .....
SEQ    AKGQPREPQVYTLPPSREENTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
      370      380      390      400      410      420

      430      440      450      460
SEQ ID DSDGSFPLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
      .....
SEQ    DSDGSFPLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
      430      440      450      460
```

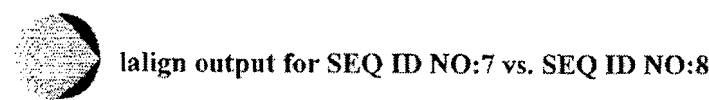
[Back to ISREC bioinformatics group home page](#)

APÉNDICE 5

ALINEAMIENTO GLOBAL DE LA SEQ ID No. 7 versus SEQ ID No. 8

000015

Readseq version 2.1.30 (12-May-2010) Readseq version 2.1.30 (12-May-2010)



[ISREC-Server] Date: Tue Apr 3 21:30:29 2012

./wwwtmp/.14356.1.seq : 474 aa

ALIGN calculates a global alignment of two sequences
version 2.2u
Please cite: Myers and Miller, CABIOS (1989) 4:11-17
SEQ ID NO:7 474 bp 474 aa vs.
SEQ ID NO:8 474 bp 474 aa
using matrix file: BLOSUM50, gap open/ext: -14/-4
99.8% identity in 474 aa overlap; Global score: 3211

	10	20	30	40	50	60
SEQ ID	MGSTAILALLLAVLQGVCAEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMP					
						
SEQ	MGSTAILALLLAVLQGVCAEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMP					
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
SEQ ID	GKGLEWMGIITYPGDS DTRYSPSFQGVITISADKSTISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGTA					
						
SEQ	GKGLEWMGIITYPGDS DTRYSPSFQGVITISADKSTISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGTA					
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150	160	170	180
SEQ ID	AGRDYYYYYGM DVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPASKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP					
						
SEQ	AGRDYYYYYGM DVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP					
	130	140	150	160	170	180
	190	200	210	220	230	240
SEQ ID	VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK					
						
SEQ	VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK					
	190	200	210	220	230	240
	250	260	270	280	290	300
SEQ ID	RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV					
						
SEQ	RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV					
	250	260	270	280	290	300
	310	320	330	340	350	360
SEQ ID	KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE					
						
SEQ	KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE					
	310	320	330	340	350	360
	370	380	390	400	410	420

lalign output for SEQ ID NO:7 vs. SEQ ID NO:8

Page 2 of 2

```
SEQ ID KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
      .....
SEQ      KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
           370      380      390      400      410      420

           430      440      450      460      470
SEQ ID TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
      .....
SEQ      TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
           430      440      450      460      470
```

[Back to ISREC bioinformatics group home page](#)

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
MODIFICACIONES Y/O CORRECCIONES

1. Identificación del Trámite

☐ Error material

☒ Modificación a una Solicitud en trámite

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Registro de Diseño Industrial

☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐

Persona Jurídica ☒

CHIRON CORPORATION

Nombre o denominación / Nombre o razón social completa

Nombre representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	4560 Horton Street, Emeryville, CA 94608-2916	EMERYVILLE
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

RODRÍGUEZ D'ALEMAN DILIA MARÍA

C.C. 41.654.882

20824 CSJ

Apellidos y Nombre

Documento de identificación

Tarjeta profesional

Dirección y domicilio	Ciudad	
Carrera 11 No. 86-53, Piso 6, Bogotá D.C., Colombia	Bogotá D.C.	
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
<u>info@clarkemodet.com.co</u>	6350824	6181088

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____

000019

4. Datos del trámite

Corrección:

Expediente No. _____

Aparece _____

Debe ser _____

Modificación:

☒ Modificación al capítulo reivindicatorio.
Se presenta nuevo capítulo reivindicatorio conformado ahora por 17 reivindicaciones.

☐ Modificación al capítulo descriptivo.

☐ Modificación al capítulo descriptivo.

☐ Modificación al resumen.

☐ Modificación a los dibujos.

5. Anexos

☐ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación

☐ Poder, si fuere el caso.

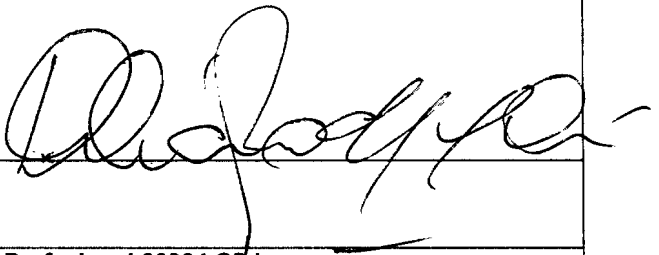
☒ Documento que contiene las modificaciones o correcciones.

☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético.

6. Firma

DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN
Nombre y apellidos

Firma



C.C. 41.654.882

Tarjeta Profesional 20824 CSJ

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humano que es capaz de unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expresado en la superficie de una célula que expresa el CD40 humano, dicho anticuerpo monoclonal siendo libre de actividad agonista significativa, de tal suerte que cuando dicho anticuerpo monoclonal se une al anticuerpo CD40 expresado sobre la superficie de dicha célula, el crecimiento o diferenciación de dicha célula se inhibe, en donde dicho anticuerpo se encuentra caracterizado porque se selecciona a partir del grupo que consiste de:

a) un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena ligera que contiene los residuos 21-132 de la SEQ ID No.: 2 y un dominio variable de cadena pesada que contiene los residuos 20-139 de SEQ ID No.: 4; y

b) un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena ligera que contiene los residuos 21-132 de SEQ ID No. 6 y un dominio variable de cadena pesada que contiene los residuos 20-144 de SEQ ID No. 7.

2. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo es seleccionado del grupo que consiste del anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 obtenible a partir de la línea de célula de hibridoma depositada con el ATCC como

000000

Depósito de Patente No. 5542 y del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 obtenible a partir de la línea de célula de hibridoma depositada con el ATCC como Depósito de Patente No. PTA-5543.

5

3. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho anticuerpo es seleccionado del grupo que consiste de:

10 i. un anticuerpo monoclonal que comprende los residuos 21-239 de la SEQ ID No. 2 y los residuos 20-469 de la SEQ ID No. 4;

ii. un anticuerpo monoclonal que comprende los residuos 21-239 de la SEQ ID No. 2 y Residuos 20-469 de la SEQ ID No. 5;

15 iii. un anticuerpo monoclonal que comprende la SEQ ID No. 2 y SEQ ID No. 4; y

iv. un anticuerpo monoclonal que comprende la SEQ ID No. 2 y SEQ ID No. 5.

20

4. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de:

25 i. un anticuerpo monoclonal que comprende los residuos 21-239 de la SEQ ID No. 6; y los residuos 20-474 de la SEQ ID No. 7;

ii. un anticuerpo monoclonal que comprende los residuos 21-239 de la SEQ ID No. 6; y los residuos 20-474 de la SEQ ID No. 8;

000020

- iii. un anticuerpo monoclonal que comprende la SEQ ID No. 6; y SEQ ID No. 7; y
- iv. un anticuerpo monoclonal que comprende la SEQ ID No. 6; y SEQ ID No. 8;

5

5. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque dicho anticuerpo monoclonal se une a dicho antígeno CD40 humano con una afinidad (K_D) de al menos 10^{-6} M.

10

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

15

7. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo monoclonal es un fragmento enlazante de antígeno de un anticuerpo monoclonal, en donde dicho fragmento se une específicamente a dicho antígeno CD40 humano y caracterizado porque dicho fragmento se selecciona del grupo que consiste de un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento Fv y un fragmento Fv de cadena sencilla.

20

8. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado

000000

porque dicho anticuerpo monoclonal es producido en una línea de célula CHO.

5 9. Una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4 y 7.

10 10. La línea de célula de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

15 11. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-CD40 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde dicha composición es una formulación farmacéutica líquida que tiene un pH de 5.0 a 7.0, y dicha formulación comprende un amortiguador a una concentración de 1mM a 50 mM, en donde dicho amortiguador es un ácido o una sal del mismo
20 seleccionado del grupo que consiste de ácido succínico o succinato, ácido cítrico o citrato, ácido acético o acetato, ácido tartárico o tartrato, ácido fosfórico o fosfato, ácido glucónico o gloconato, ácido glutámico o glutamato, ácido aspártico o
25 aspartato, ácido maléico o maleato y ácido málico o malato.

12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11,
en donde dicha formulación comprende cloruro de sodio
a una concentración de 50 mM a 300 mM.

5 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12,
en donde dicho cloruro de sodio está presente es
dicha formulación en una concentración de 150 mM.

10 14. La composición farmacéutica de una cualquiera de las
reivindicaciones 11 a 13, en donde dicho amortiguador
se selecciona del grupo que consiste de
amortiguadores de succinato, citrato, y de fosfato.

15 15. La composición farmacéutica de la reivindicación 14,
en donde dicho amortiguador es succinato de sodio o
citrato de sodio en una concentración de desde 5 mM
hasta 15 mM.

20 16. La composición farmacéutica de cualquiera de las
reivindicaciones 11 a 15, en donde dicha formulación
comprende adicionalmente un tensoactivo en una
cantidad de desde 0.001% hasta 1.0% y en donde dicho
tensoactivo es polisorbato 80 ó polisorbato 20.

25 17. La composición farmacéutica de la reivindicación 16,
en donde dicho tensoactivo es polisorbato 80 y el
cual está presente en dicha formulación en una
cantidad de desde 0.001% hasta 0.5%.

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

- ☐ Conversión ☒ División ☐ Fusión
- ☒ Patente de Invención
☐ Patente de Modelo de Utilidad
☐ Registro de Diseño Industrial
☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐

Persona Jurídica ☒

CHIRON CORPORATION

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	4560 Horton Street, Emeryville, CA 94608-2916	EMERYVILLE
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

RODRÍGUEZ D'ALEMAN DILIA MARÍA

C.C. 41.654.882

20824 CSJ

Apellidos y Nombre

Documento de identificación

Tarjeta profesional

Dirección y domicilio	Ciudad	
Carrera 11 No. 86-53, Piso 6, Bogotá D.C., Colombia	Bogotá D.C.	
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
clarkemodet@clarkemodet.com.co	6350824	6181088

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____

000 124

4. Datos del trámite

CONVERSION

Expediente _____

De: _____

A: _____

DIVISION

Expediente

06-054.042A

De: _____

A: _____

FUSION

Expediente _____

De: _____

A: _____

5. Comprobante de Pago No _____ Fecha **09 / 05 / 2012**

6. Anexos

☒

Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación

☐

Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación

☐

Número de documento que ordena la comisión o fusión o división

☐

Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud

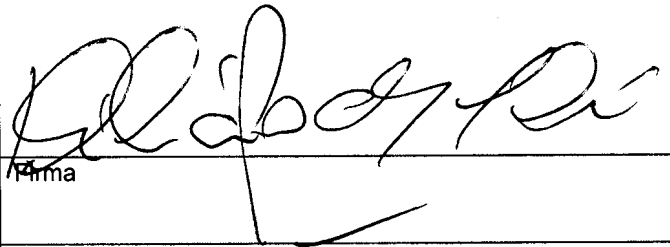
☐

Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma

DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

Nombre y apellidos



Firma

C.C. 41.654.882

Tarjeta Profesional 20824 CSJ

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0045757
		Bogotá D.C., Mayo 09 de 2012 - 14:56:40

RECIBIDO DE : CLARKE MODET	NI 830.008.643
----------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	39166	23/04/2012		100.000.00
RECIBO DE CA	999999999	44903	07/05/2012		22.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	
1	50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICACIONES EN CREACION CORRECCION A SOLICITUD EN TRAMITE / MODIFICA		
		Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
		120.000.00	120.000.00
			\$120.000.00

SON: **CIENTO VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 06-054042- -00011-0000
Fecha: 2012-05-09 15:25:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 265

25

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. 06-054.042A

54. TITULO: ANTICUERPOS ANTAGONISTAS ANTI-CD40
MONOCLONALES Y MÉTODOS PARA SU USO

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL C07K 16/00

71. SOLICITANTE: CHIRON CORPORATION

DOMICILIO: EMERYVILLE, ESTADO DE
CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. APODERADO DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C.

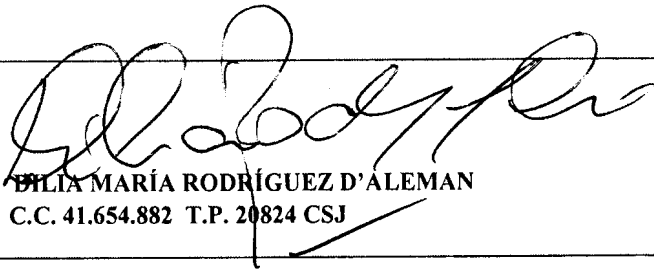
Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	Espacio reservado para el adhesivo de radicación
--	---

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES06-054.042A

SOLICITUD FASE NACIONAL – PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
	Solicitud Internacional No.	PCT/US2004/037152	Fecha 4 de Noviembre de 2004
	Publicación Internacional No.	WO 2005/044854 A2	Fecha 19 de Mayo de 2005
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
	Anticuerpos Antagonistas Anti-CD40 Monoclonales y Métodos para su Uso		
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) C07K 16/00		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
	APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
	CHIRON CORPORATION		
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
	DIRECCIÓN: 4560 Horton Street, Emeryville, CA 94608-2916		
	No. TELÉFONO:		
	CORREO ELECTRONICO:		
	CIUDAD: Emeryville		
	LUGAR DE CONSTITUCIÓN: Estado de California, Estados Unidos de América		
	PAÍS DE RESIDENCIA: Estados Unidos de América		
7	INVENTOR (ES) VER HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA PCT		
	APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
	1		
	2		
	DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:		
8	DATOS INVENTOR (ES)		
	PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD
	1.		
	2.		
	OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)		
	☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.		
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
	APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
	RODRÍGUEZ D'ALEMAN	DILIA MARÍA	C.C. 41.654.882 T.P.20824 CSJ
	DIRECCIÓN Carrera 11 No. 86-53, Piso 6		
	No. TELÉFONO 6181088		
	CIUDAD Bogotá D.C.		
	CORREO ELECTRÓNICO clarkemodet@clarkemodet.com.co		
	No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL		
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
	(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
	Estados Unidos de América	US	60/517,337
	2. Estados Unidos de América	US	60/525,579
	3. Estados Unidos de América	US	60/565,710
			(32) FECHA AAA/MM/DD
			2003/11/04
			2003/11/26
			2004/04/27

000027

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	Nº 12-0043376 12-0745758	Fecha 03/05/2012 09-05-12
16	FIRMA DEL APODERADO :		
 DALILA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN C.C. 41.654.882 T.P. 20824 CSJ			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción 2. ☒ Reivindicaciones 3. ☒ Dibujos y/o figuras 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☐ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital.		9. ☐ Poderes, si fuera el caso. 10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

ANEXO INVENTORES

- 1.) **LONG, Li**
(P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662-8097, Estados Unidos de América);
- 2.) **LUQMAN, Mohammada**
(P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662-8097, Estados Unidos de América);
- 3.) **YABANNAVAR, Asha**
(P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662-8097, Estados Unidos de América);
- 4.) **ZAROR, Isabel**
(P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662-8097, Estados Unidos de América);
- 5.) **CHEN, Bao-Lu**
(P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662-8097, Estados Unidos de América);
- 6.) **LU, Xiaofeng**
(P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662-8097, Estados Unidos de América);
- 7.) **LEE, Sang, Hoon**
(P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662-8097, Estados Unidos de América);
- 8.) **HURST, Deborah**
(P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662-8097, Estados Unidos de América);

ANTICUERPOS ANTAGONISTAS ANTI-CD40 MONOCLONALES Y MÉTODOS**PARA SU USO****CAMPO DE LA INVENCION**

La invención se relaciona con anticuerpos humanos capaces de unirse a CD40, métodos de uso de los anticuerpos y métodos para el tratamiento de enfermedades mediadas por la estimulación de la señalización CD40 sobre células que expresan CD40.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las células B juegan un papel importante durante la respuesta inmune normal in vivo. Un antígeno extraño se unirá a las inmunoglobulinas de superficie sobre las células B específicas, disparando una cadena de eventos que incluyen endocitosis, procesamiento, presentación de péptidos procesados sobre las moléculas MHC-clase II, y sobre regulación de antígeno B7 sobre la superficie de la célula B. Una célula T específica se une entonces a la célula B por vía del reconocimiento del receptor de célula T (TCR) del antígeno procesado presentado sobre la molécula MHC-clase II. La estimulación a través del TCR activa la célula T e inicia la producción de citocina de célula T. Una segunda señal que activa adicionalmente la célula T es una interacción entre el antígeno CD28 sobre las células T y el antígeno B7 sobre las células B. Cuando se reciben las señales anteriormente mencionadas, el ligando CD40 (CD40L o CD154), que

000073

no se expresa sobre las células T humanas de descanso, sobre reguladas sobre la superficie de célula T. La unión del ligando CD40 al antígeno CD40 sobre la superficie de célula B estimula la célula B, originando que la célula B madure en una célula de plasma que secreta altos niveles de inmunoglobulina soluble.

El CD40 es un antígeno de superficie de célula de 55 kDa presente sobre la superficie tanto de células B humanas normales como neoplásicas, células dendríticas, células que presentan antígeno (APC), células endoteliales, células monocíticas y epiteliales. Las células transformadas de los pacientes con linfomas de célula B de bajo y alto grado, leucemia linfoblástica aguda de célula B, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica y enfermedad de Hodgkin expresa CD40. La expresión de CD40 también se detecta en dos tercios de los casos de leucemia mieloblástica aguda y 50% de los linfomas relacionados con SIDA. Las células B malignas provenientes de varios tumores de linaje de célula B expresan un alto grado de CD40 y parecen depender sobre la señalización CD40 para supervivencia y proliferación.

Los linfomas de célula B inmunoblásticos surge frecuentemente en individuos inmunocomprometidos tales como receptores de aloinjerto y otros que reciben terapia inmunosupresora de largo plazo, pacientes de SIDA, y pacientes con síndrome de inmunodeficiencia primaria tales como el síndrome linfoproliferativo ligado a X o el síndrome Wiscott-Aldrich

000030

(Thomas et al. (1991) *Adv. Cancer Res.* 57: 329; Straus et al. (1993) *Ann. Intern. Med.* 118: 45).

El antígeno CD40 está relacionado con el receptor del factor de crecimiento nervioso humano (NGF), el receptor de factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α), y Fas, sugiriendo que el CD40 es un receptor para un ligando con funciones importantes en la activación de la célula B. La expresión del CD40 sobre los APC juegan un papel co-estimulador importante en la activación tanto de los ayudantes T como de los linfocitos T citotóxicos. El receptor CD40 se expresa sobre las células T activadas, las plaquetas activadas, y las células musculares lisas vasculares inflamadas. Los receptores CD40 también se pueden encontrar sobre los eosinófilos, las membranas sinoviales en artritis reumatoide los fibroblastos dérmicos, y otros tipos de célula no linfóide. La unión de CD40L al receptor de CD40 estimula la proliferación y diferenciación de célula B, la producción de anticuerpo, la conmutación de isotipo, y la generación de memoria de célula B.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

Las composiciones y métodos se suministran para el tratamiento de enfermedades mediadas por la estimulación de señalización CD40 sobre células que expresan CD40, incluyendo linfomas, enfermedades autoinmunes, y rechazos por transplante. Las composiciones incluyen anticuerpos monoclonales capaces de unirse al antígeno CD40 humano localizado sobre la superficie de

000031

una célula que expresa CD40 humano, en donde la unión evita el crecimiento o la diferenciación de la célula. Las composiciones también incluyen anticuerpos monoclonales capaces de unirse específicamente al antígeno CD40 humano expresado sobre la superficie de una célula que expresa CD40 humano, dicho anticuerpo monoclonal está libre de actividad agonista significativa, en donde la administración de dicho anticuerpo monoclonal da como resultado significativamente menos volumen tumoral que una concentración similar de anticuerpo monoclonal anti-CDD20 quimérico IDEC-C2B8 en un modelo de etapas de tumor de xenoinjerto de ratón desnudo utilizando la línea celular de linfoma de célula B humana Daudi. Las composiciones también incluyen fragmentos de unión de antígeno de estos anticuerpos monoclonales, líneas de célula de hibridoma que producen estos anticuerpos, y moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican las secuencias de aminoácidos de estos anticuerpos monoclonales. La invención incluye además composiciones farmacéuticas que comprenden estos anticuerpos anti-CD40 en un portador farmacéuticamente aceptable.

Se suministran métodos para prevenir o tratar una enfermedad mediada por la estimulación de señalización CD40, que comprende tratar el paciente con un anticuerpo anti-CD40 o un fragmento de unión de antígeno de este que está libre de actividad sin agonista significativo cuando se une a un antígeno CD40 sobre una célula que expresa CD40 humano. Las enfermedades mediadas por la estimulación de las células que expresan CD40 incluyen

000032

enfermedades autoinmunes, cánceres, y rechazos de injerto de órgano y tejido. Los linfomas que se pueden tratar o prevenir por un método de la presente invención incluyen linfomas no-Hodgkin (linfomas de alto grado, linfomas de grado intermedio, y linfomas de bajo grado), enfermedad de Hodgkin, leucemias linfoblásticas agudas, mielomas, leucemias linfocíticas crónicas, y leucemias mieloblásticas.

Las enfermedades autoinmunes particulares contempladas para el tratamiento que utiliza los métodos de la invención incluye lupus sistémico eritematoso (SLE), artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, soriasis, púrpura trombocitopénica autoinmune, esclerosis múltiple, espondilitis anquilosante, miastenia gravis, y penfigus vulgaris. Tales anticuerpos también se pueden utilizar para evitar el rechazo de un órgano y el injerto de tejido al suprimir las respuestas autoinmunes, para tratar linfomas al privar a los linfocitos B malignos de señal activante suministrada por el CD40, y suministrar toxinas a las células que llevan CD40 de una manera específica.

Se suministran métodos para inhibir el crecimiento, diferenciación, y/o la proliferación de células B humanas y para inhibir la producción de anticuerpo mediante células B en un paciente humano, como son los métodos para inhibir el crecimiento de células cancerígenas de un linaje de célula B. Los métodos para identificar anticuerpos que tengan actividad antagonista hacia células que expresan CD40 también se suministran.

000033

Los anticuerpos monoclonales descritos aquí tienen una fuerte afinidad por el CD40 y se caracteriza por una constante de equilibrio de disociación (K_D) de al menos 10^{-6} M, preferiblemente al menos 10^{-7} M a aproximadamente 10^8 M, más preferiblemente al menos 10^{-8} M a aproximadamente 10^{-12} M. Los anticuerpos monoclonales y los fragmentos que se unen a antígeno de este que son adecuados para uso en los métodos de la invención son capaces de unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expresado sobre la superficie de una célula humana. Ellos están libres de actividad agonista significativa pero exhiben actividad antagonista cuando se unen a un antígeno CD40 sobre células humanas. En una modalidad, el anticuerpo anti-CD40 o los fragmentos de estos exhiben actividad antagonista cuando se unen a un antígeno CD40 sobre células B humanas normales. En otra modalidad, el anticuerpo anti-CD40 o fragmentos de estos exhiben actividad antagonista cuando se unen al antígeno CD40 sobre células B humanas malignas. Los anticuerpos monoclonales adecuados tiene regiones constantes humanas; preferiblemente ellas también tiene regiones de estructura completa o parcialmente humanizada; y más preferiblemente son anticuerpos completamente humanos o fragmentos que se unen a antígeno de estos. Los ejemplos de tales anticuerpos monoclonales son los anticuerpos designados aquí como CHIR-5.9 y CHIR-12.12; Los anticuerpos monoclonales producidos mediante las líneas de célula de hibridoma designadas 131.2F8.5.9 (denominadas aquí como la línea celular 5.9) y 153.8E2.D10.D6.12.12 (denominada aquí como

000034

línea celular 12.12); un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la secuencia mostrada en la ID de SEC No.: 6, la secuencia mostrada en la ID de SEC No.: 7, la secuencia mostrada en la ID de SEC No.: 8, ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 6 y la ID de SEC No.: 7, y ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 6, y ID de SEC No.: 8; un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la secuencia mostrada en la ID de SEC No.: 2, la secuencia mostrada en la ID de SEC No.: 4, la secuencia mostrada en la ID de SEC No.: 5, ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 2 y la ID de SEC No.: 4, y ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 2, y ID de SEC No.: 5; un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de la secuencia mostrada en la ID de SEC No.: 1, la secuencia mostrada en la ID de SEC No.: 3, y ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 1, y ID de SEC No.: 3; los fragmentos que se unen a antígeno de los anticuerpos monoclonales que retiene la capacidad de unirse específicamente al CD40 humana, y que están libres de actividad agonista significativa pero exhiben actividad antagonista cuando se unen al antígeno CD40 sobre células humanas. Ejemplo de tales anticuerpos monoclonales también incluyen un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 12.12; un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los

000035

residuos 82-87 de la secuencia de aminoácido mostrada en la ID de SEC No.: 10 o la ID de SEC No.: 12; un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitivo; y un anticuerpo monoclonal que es un fragmento que se une a antígeno del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores, donde el fragmento retiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno CD40 humano. Aquellos expertos en la técnica reconocen que los anticuerpos antagonistas y los fragmentos que se unen a antígenos de estos anticuerpos descritos aquí incluyen anticuerpos de fragmentos que se unen a antígeno de estos que son producidos recombinantemente utilizando métodos bien conocidos en la técnica y descritos aquí adelante, e incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 que han sido recombinantemente producidos.

En una modalidad de la invención, los métodos de tratamiento comprenden administrar a un paciente una dosis terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende anticuerpos anti-CD40 antagonistas adecuados o fragmentos que se unen a antígeno de estos. Una dosis terapéuticamente efectiva del anticuerpo anti-CD40 o un fragmento de este está en el rango desde aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, desde aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, desde

000036

aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, desde aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, o desde aproximadamente 7 mg/kg a aproximadamente 12 mg/kg. Se reconoce que el método de tratamiento puede comprender una administración simple de una dosis terapéuticamente efectiva o una administración múltiple de una dosis terapéuticamente efectiva del anticuerpo antagonista anti-CD40 o de un fragmento de unión de antígeno de este.

Los anticuerpos antagonistas anti-CD40 identificados aquí por ser adecuados para uso en los métodos de la invención se pueden modificar. Las modificaciones de estos anticuerpos antagonistas anti-CD40 incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos quiméricos anti-CD40 inmunológicamente activos, anticuerpos humanizados anti-CD40, y anticuerpos anti-CD40 de murino inmunológicamente activos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra la unión de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 a CD40 sobre la superficie de línea celular de linfoma (Ramos).

Las figuras 2A y 2B ilustran las propiedades de unión de los anticuerpos monoclonales anti-CD40 CHIR-5.9 y CHIR-12.12 con relación al ligando CD40. La figura 2A muestra que la unión de

000037

los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 al CD40 de la superficie celular evita la unión de CD40-ligando subsecuente. La figura 2B muestra que los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 pueden competir fuera de ligando CD40 preunido al CD40 de superficie celular.

Las figuras 3A y 3B muestran actividad ADCC de los anticuerpos monoclonales candidatos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 contra células cancerígenas provenientes de nodos linfáticos de pacientes con linfoma no Hodgkin (NHL). Las células NK enriquecidas provenientes de un donador voluntario normal frescas después de aislamiento (figura 3A) o después de cultivar durante toda la noche a 37° C (figura 3B) fueron utilizadas como células efectuatoras en este ensayo. Como las células NHL también expresan CD20, el antígeno objetivo para rituximab (Rituxan®), actividad ADCC del candidato mAbs se compara con aquella del rituximab.

La figura 4 demuestra actividad anti-tumoral in vivo de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 comparados con aquellos del rituximab utilizando un modelo sin etapas de linfoma de célula B de xenoinjerto de ratón desnudo (Namalwa).

La figura 5 demuestra actividad anti-tumoral in vivo de anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 comparados con aquellos del rituximab que utiliza un modelo de no etapas de

linfoma de célula B de xenoinjerto de ratón desnudo (Daudi). RC resistencia a ataque tumoral.

La figura 6 demuestra actividad anti-tumoral in vivo de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 comparados con aquellos de rituximab que utilizan un modelo de etapas de linfoma de célula B de xenoinjerto de ratón desnudo (Daudi). CR regresión completa.

La figura 7 muestra el protocolo utilizado para determinar el número de moléculas CD20 y CD40 sobre las células Namalwa y Daudi.

La figura 8 muestra el ADCC comparativo del mAb CHIR-12.12 y rituximab contra las células de linfoma Daudi.

La figura 9 establece las secuencias de aminoácido para las cadenas ligera y pesada del mAb CHIR-12.12. Las regiones líder (residuos 1-20 de la ID de SEC No.: 2), variable (residuos 21-132 de la ID de SEC No.: 2), y constantes (residuos 133-239 de la ID de SEC No.: 2) de la cadena ligera se muestran en la figura 9A. Las regiones líder (residuos 1-19 de la ID de SEC No.: 4), variable (residuos 20-139 de la ID de SEC No.: 4), y constantes (residuos 140-469 de la ID de SEC No.: 4) de la cadena pesada se muestran en la figura 9B. La región constante alternativa para la cadena pesada del mAb del CHIR-12.12 mostrado en la figura 9B refleja una sustitución de un residuo de serina por el residuo de

000039

alanina en la posición 153 de la ID de SEC No.: 4. La secuencia completa de esta variante de la cadena pesada del mAb CHIR-12.12 se establece en la ID de SEC No.: 5.

La figura 10 muestra las secuencias de codificación de la cadena ligera (figura 10A; ID de SEC No.: 1) y cadena pesada (figura B; ID de SEC No.: 3) para el mAb CHIR-12.12.

La figura 11 establece las secuencias de aminoácido para las cadenas ligera y pesada del mAb CHIR-5.9. Las regiones líder (residuos 1-20 de la ID de SEC No.: 6), variable (residuos 21-132 de la ID de SEC No.: 6), y constantes (residuos 133-239 de la ID de SEC No.: 6) de la cadena ligera se muestran en la figura 11A. Las regiones líder (residuos 1-19 de la ID de SEC No.: 7), variable (residuos 20-144 de la ID de SEC No.: 7), y constantes (residuos 145-474 de la ID de SEC No.: 7) de la cadena pesada se muestran en la figura 11B. La región constante alternativa para la cadena pesada del mAb del CHIR-5.9 mostrada en la figura 11B refleja una sustitución de un residuo serina por el residuo de alanina en la posición 158 de la ID de SEC No.: 7. La secuencia completa para esta variante de la cadena pesada del mAb CHIR-5.9 se establece en la ID de SEC No.: 8.

La figura 12 muestra la secuencia de codificación (figura 12A; ID de SEC No.: 9) para la isoforma corta de CD40 humano (secuencia de aminoácido mostrada en la figura 12B; ID de SEC No.: 10), y la secuencia codificante (figura 12C; ID de SEC No.:

000040

11) para la isoforma larga del CD40 humano (secuencia de aminoácido mostrada en la figura 12D).

La figura 13 muestra temperatura de fusión térmica de CHIR-12.12 en formulaciones de pH diferentes medidas mediante calorimetría de exploración diferencial (DSC).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

"Tumor", como se utiliza aquí, se refiere a todo crecimiento y proliferación de célula neoplásica, sea maligno o benigno, y todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en mamífero que se caracteriza típicamente por crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen pero no están limitados a linfoma y leucemia.

"Anticuerpos" y "inmunoglobulinas" (Igs) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Aunque los anticuerpos exhiben especificidad de unión a un antígeno, las inmunoglobulinas incluyen tanto los anticuerpos como otras moléculas similares a anticuerpo a los que le falta especificidad de antígeno. Los péptidos de la última clase son, por ejemplo, producidos a niveles bajos mediante el sistema de linfa y niveles crecientes de mieloma.

000041

El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y cubre anticuerpos completamente ensamblados, fragmentos de anticuerpo que se pueden unir a antígeno (por ejemplo Fab', F(ab)₂, Fv, anticuerpos de cadena simple, diacuerpos), y péptidos recombinantes que comprenden los anteriores.

El término "anticuerpo monoclonal" como se utiliza aquí se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos substancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de ocurrencia natural que se pueden presentar cantidades menores.

"Anticuerpos nativos" y "inmunoglobulinas nativas" son usualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150,000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas (H). Cada cadena ligera está ligada a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesada de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera tiene también puentes disulfuro intra cadena regularmente espaciados. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio de variable (V_H) seguido por un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en el otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio de variable

de cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Los residuos de aminoácido particulares se cree que forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y pesada.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren extensivamente en secuencia entre los anticuerpos y son utilizados en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está homogéneamente distribuida a través de los dominios variables de los anticuerpos. Este se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (CDR) o regiones hipervariables ambas en los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables son denominadas las regiones de estructura (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprende cada una cuatro regiones FR, que adoptan largamente una configuración de lámina β , conectadas por tres CDR que forman aros conectantes, en algunos casos formando parte de la estructura de lámina β . Los CDR en cada cadena son mantenidos juntos en proximidad cercana por las regiones FR y, con los CDR provenientes de otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión de antígeno de los anticuerpos (ver Kabat *et al.* (1991) NIH Publ. No. 91-3242, Vol. páginas 647-669).

000043

Los dominios constantes no se involucran directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, sino que exhiben varias funciones efectuatoras, tales como la unión de receptor Fc (FcR), participación del anticuerpo en toxicidad celular dependiente del anticuerpo, opsonización, iniciación de citotoxicidad dependiente de complemento, y desgranulación de célula mástil.

El término "región hipervariable" cuando se utiliza aquí se refiere a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables por la unión de antígeno. La región hipervariable comprende los residuos de aminoácido provenientes de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (es decir, los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2), y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2), y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat et al (1991) *Secuencias of Proteins of Innunological Interest* (5th ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD) y/o aquellos residuos provenientes de un "aro hipervariable" es decir los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2), y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2), y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Clothia and Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917). "Estructura" o residuos "FR" son aquellos residuos de dominio variable diferentes de los residuos de región hipervariable.

"Fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la unión de antígeno o la

000044

región variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmento de anticuerpo incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, y los fragmentos Fv; diacuerpos; Anticuerpos lineales (Zapata et al. (1995) *Protein Eng* 8 (10): 1057-1062); Moléculas de anticuerpo de cadena simple; y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpo. La digestión de papaina de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión de antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un sitio de unión de antígeno simple, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento de pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y es capaz de reticular antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un reconocimiento de antígeno completo y sitio de unión. En las especies Fv de dos cadenas, esta región consiste de un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha, no covalente. Unas especies Fv de cadena simple, un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera se pueden ligar covalentemente mediante un ligador de péptido flexible de tal forma que las cadenas ligera y pesada puedan asociarse en una estructura "dimérica" análoga a aquella en especies Fv de dos cadenas. Es en esta configuración que los tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión de antígeno sobre la superficie del dímero V_H-V_L. Colectivamente, los seis CDR le confieren especificidad de unión de antígeno al anticuerpo. Sin embargo, aun un dominio variable

000045

simple (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDR específicos para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer un antígeno de unión, aunque a una afinidad inferior que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab contiene también el dominio constante de cadena ligera y el primer dominio constante (C_{H1}) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' por la adición de unos pocos residuos en el terminal carboxi del dominio C_{H1} de cadena pesada que incluye una o más cisteínas provenientes de la región de pivoteo del anticuerpo. El Fab'-SH es la designación aquí para Fab' en la cual el o los residuos de cisteína del dominio constante llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ originalmente fueron producidos en pares de fragmentos Fab' que tiene cisteínas pivote entre ellas. Otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo también son conocidos.

Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) provenientes de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a dos tipos claramente distintos, denominados kapa (κ) y lambda (λ), basados en la secuencia de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia del aminoácido del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de

000046

inmunoglobulinas humanas: IgA, IgD, IgE, IgG, E IgM, varias de estas pueden ser adicionalmente divididas en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a diferentes clases de inmunoglobulina son denominados alfa, delta, epsilon, gama, y mu, respectivamente. Las estructuras unitarias y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Diferentes isotipos tienen diferentes funciones efectuatoras. Por ejemplo, los isotipos IgG1, IgG3 humanos median la actividad de citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC).

La palabra "marcador" cuando se utiliza aquí se refiere a un compuesto detectable o composición que está conjugado directa o indirectamente al anticuerpo con el fin de generar un anticuerpo "marcado". El marcador puede ser detectable por si mismo (por ejemplo marcadores de radioisótopo o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable. Los radionuclidos que pueden servir como marcadores detectables incluyen, por ejemplo, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, y Pd-109. El marcador también podría ser una entidad no detectable tal como una toxina.

El término "antagonista" se utiliza en el sentido amplio, e incluye cualquier molécula que bloquee particular o

000047

completamente, inhiba, o neutralice una actividad biológica de un objetivo nativo descrito aquí o transcripción o traducción de este.

"Portadores" como se utilizan aquí, incluyen portadores farmacéuticamente aceptables, excipientes o estabilizadores que sean no tóxicos a la célula o al mamífero que está siendo expuesto a este en las dosis y concentraciones empleadas. A menudo el portador fisiológicamente aceptable es una solución amortiguada de pH acuoso. Ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables incluyen amortiguadores tales como fosfato, citrato, succinato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensosactivos no iónicos tales como TWEEN, polietilen glicol (PEG), y Plurónicos. La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultanea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

Una "célula huésped", como se utiliza aquí, se refiere a un microorganismo o a una célula eucariótica o línea celular cultivada como una entidad unicelular que puede ser, o ha sido utilizada como receptor para un vector recombinante u otros polinucleótidos de transferencia e incluyen la progenie de la célula original que ha sido transfectada. Se entiende que la progenie de una célula simple puede no necesariamente ser completamente idéntica en morfología o en genómica al complemento de ADN total como el padre original, debido a mutación natural, accidental o deliberada.

"Células efectuatoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y desarrollan funciones efectuatoras. Preferiblemente, las células expresan al menos FcγRIII y llevan a cabo función efectora de citotoxicidad mediada por célula dependiente de antígeno (ADCC). Ejemplos de leucocitos humanos que median ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, macrófagos, eosinófilos, y neutrófilos, siendo las células PBMC y NK las preferidas. Los anticuerpos que tiene actividad ADCC son típicamente del isotipo IgG1 o IgG3. Nótese que además del aislamiento de los anticuerpos IgG1 e IgG3, tales anticuerpos mediados por ADCC se pueden hacer mediante ingeniería de una región variable proveniente de un anticuerpo no ADCC o fragmento de región variable a una región constante de isotipo IgG1 ó IgG3.

000049

Los términos "receptor Fc" o "FcR" son utilizados para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. Los FcR preferidos son los FcR humanos de secuencia nativa. Más aun, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gama) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, que incluyen variantes alélicas y formas alternativamente empalmadas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activante" y FcγRIIB (un receptor inhibiente) que tiene secuencias de aminoácidos similares que difieren en los dominios citoplasmáticos de estos. El receptor activante FcγRIIA contiene un motivo de actividad basado en tirosina inmunoreceptora (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunoreceptora (ITIM) en su dominio citoplasmático (ver Daeron (1997) *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234). Los FcRs son revisados 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) *Lab. Clin. Med.* 126: 330-341. Otros FcR, que incluyen aquellos para identificados en el futuro, están comprendidos aquí por el término "FcR". El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable por la transferencia de los IgG maternos al feto (Guyer et al (1976) *J Immunol.* 117: 587 and Kim et al. (1994) *J. Immunol.* 24: 249 (1994)).

Existen numerosas maneras de hacer anticuerpos humanos. Por ejemplo, secretar células que pueden ser inmortalizadas mediante

000050

infección con el virus Epstein-Barr (EBV). Sin embargo, las células infectadas con EBV son difíciles de clonar y usualmente producen solo rendimientos relativamente bajos de inmunoglobulina (James and Bell (1987) *Immunol. Methods* 100: 5-40). En el futuro, la inmortalización de células B humanas podría posiblemente ser lograda al introducir una combinación definida de genes transformantes. Tal posibilidad es resaltada por una demostración reciente de que la expresión de la subunidad catalítica telomerasa junto con la oncoproteína grande SV40 y el alelo oncogénico del H-ras da como resultado una conversión tumorigénica de células epiteliales y de fibroblasto humanas normales (Hahn et al. (1999) *Nature* 400: 464-468). Ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo ratones) que sean capaces, luego de inmunización, de producir un repertorio de anticuerpos humanos en la ausencia de producción de inmunoglobulina endógena (Jakobovits et al. (1993) *Nature* 362: 255-258; Lonberg and Huszar (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13: 65-93; Fishwild et al. (1996) *Nat. Biotechnol.* 14: 845-851; Mendez et al. (1997) *Nat. Genet.* 15: 146-156; Green (1999) *J. Immunol. Methods* 231: 11-23; Tomizuka et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 722-727; revisado en Little et al. (2000) *Immunol. Today* 21: 364-370). Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigota del gen de región de unión de cadena pesada de anticuerpo (J_H) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. (Jakobovits et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551-2555). La transferencia del arreglo de gen de

000051

inmunoglobulina de línea germinal humana en tales ratones mutantes de línea germinal en la producción de anticuerpos humanos luego de inoculación de antígeno (Jakobovits *et al.* (1993) *Nature* 362: 255-258). Mendez *et al.* (1997) (*Nature Genetics* 15: 146-156) ha generado una línea de ratones transgénicos que, cuando se inoculan con un antígeno generan anticuerpos completamente humanos de alta afinidad. Esto se logra mediante la integración de la línea germinal de los locus de cadena pesada y cadena ligera humanos mega base en ratones con supresión en el segmento J_H endógeno como se describió anteriormente. Estos ratones (tecnología de XenoMouse® II (Abgenix; Fremont, California)) albergan 1,020 kb de locus de cadena pesada humana que contiene aproximadamente 66 genes V_H, completan las regiones D_H y J_H, y tres diferentes regiones constantes, y también albergan 800 kb de locus κ humano que contiene 32 genes V_k, segmentos J_k, y genes C_k. Los anticuerpos producidos en estos ratones se asemejan cercanamente a aquellos vistos en los humanos en todos los aspectos incluyendo la redistribución de genes, el montaje y el repertorio. Los anticuerpos humanos son preferencialmente expresados sobre los anticuerpos endógenos debido a la supresión en el segmento endógeno que evita la redistribución del gen en locus de murino. Tales ratones se pueden inmunizar con un antígeno de interés particular.

El suero de tales animales inmunizados se puede seleccionar para reactividad de anticuerpo contra el antígeno inicial. Los

000052

linfocitos se pueden aislar de nodos de linfa o células de bazo y pueden adicionalmente ser seleccionados para células B al seleccionar para células negativas CD138 y positivas CD19. En un aspecto, tales células B (BCC) se pueden fusionar a las células de mieloma y generar hibridomas como se detalló anteriormente.

En otro aspecto, los cultivos de células B se pueden seleccionar además para reactividad contra el antígeno inicial, preferiblemente. Tal selección incluye ELISA con la proteína objetivo/antígeno, un ensayo de competición con anticuerpos conocidos que se unen al antígeno de interés, y unión in vitro a CHO transitoriamente transfectado u otras células que expresan el antígeno objetivo.

La presente invención está dirigida a composiciones y métodos para tratar pacientes humanos con enfermedades mediadas mediante la estimulación de señalización CD40 sobre células que expresan CD40. Los métodos involucran el tratamiento con anticuerpo anti-CD40 de la invención, o un fragmento de unión de antígeno de este, en donde la administración del anticuerpo o el fragmento que se une al antígeno de este promueve una respuesta terapéutica positiva dentro del paciente que sobrelleva este método de terapia. Los anticuerpos anti-CD40 adecuados para uso en los métodos de la invención se unen específicamente a un antígeno CD40 humano expresado sobre la superficie de una célula humana y son libres de actividad agonista significativa, pero exhiben actividad antagonista cuando se unen al antígeno CD40

000053

sobre una célula que expresa CD40 humano. Estos anticuerpos anti-CD40 y fragmentos de unión de antígeno de estos son denominados aquí como anticuerpos antagonistas anti-CD40. Tales anticuerpos incluyen pero no están limitados a, los anticuerpos monoclonales completamente humanos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos adelante y los anticuerpos monoclonales que tiene las características de unión de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12. Aquellos expertos en la técnica reconocerán que los anticuerpos antagonistas y los fragmentos que se unen a antígeno de estos anticuerpos descritos aquí incluyen anticuerpos y fragmentos que se unen a antígenos de estos que son producidos recombinantemente utilizando métodos bien conocidos en la técnica y descritos aquí adelante, e incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 que han sido recombinantemente producidos.

Los anticuerpos que tienen las características de unión de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 incluyen anticuerpos que interfieren competitivamente con la unión de CD40 y/o la unión de los mismos epítopos como el CHIR-5.9 y CHIR-12.12. Un experto podría determinar si un anticuerpo interfiere competitivamente con el CHIR-5.9 o CHIR-12.12 utilizando métodos estándar.

Cuando estos anticuerpos se unen a CD40 desplegados sobre la superficie de las células humanas, tales como las células B humanas, los anticuerpos son libres de actividad agonista significativa, en algunas modalidades, su unión al CD40

000052

desplegada sobre la superficie de las células humanas dan como resultado la inhibición de la proliferación y diferenciación de estas células humanas. Así, los anticuerpos antagonistas anti-CD40 adecuados para uso en los métodos de la invención incluyen anticuerpos monoclonales que pueden exhibir actividad antagonista hacia células normales y malignas que expresan el antígeno CD40 de superficie celular.

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD40 de la invención exhiben actividad antitumoral incrementada con relación al anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico IDEC-C2B8, donde la actividad antitumoral se ensaya con cantidades equivalentes de estos anticuerpos en un modelo de tumor de xeroinjerto de ratón desnudo utilizando líneas celulares de linfoma humano. El IDEC-C2B8 (IDEC Pharmaceuticals Corp., San Diego, California; comercialmente disponible bajo el nombre comercial Rituxan®, también denominado como rituximab) es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico que contiene las regiones constante IgG1 y kapa humanas con regiones variables de murino aisladas del anticuerpo monoclonal anti-CD20 de murino, IDEC-2B8 (Reff. et al. (1994) *Blood* 83: 435-445). El rituximab® es licenciado para el tratamiento de célula B recaída de bajo grado o linfoma no Hodgkin folicular (NHL). El descubrimiento de anticuerpos con actividad antitumoral superior comparados con el rituximab® podrían mejorar drásticamente los métodos de terapia de cáncer para linfoma de célula B particularmente linfoma no Hodgkin de célula B.

000055

Los modelos de tumor de xeroinjerto de ratón desnudo adecuados incluyen aquellos que utilizan las líneas celulares de linfoma de Burkitt humano conocidas como Namalwa y Daudi. Las modalidades preferidas ensayan actividad antitumoral en un modelo de etapas de tumor de xeroinjerto de ratón desnudo utilizando una línea celular de linfoma humano Daudi como se describe aquí adelante en el ejemplo 17. un modelo de etapas de tumor de xeroinjerto de ratón desnudo que utiliza la línea celular de linfoma Daudi es más efectivo para distinguir la eficacia terapéutica de un anticuerpo dado de lo que es un modelo sin etapas, como en la dosificación de anticuerpo de modelo de etapas que es iniciada solamente después de que el tumor ha alcanzado un tamaño medible en el modelo de no etapas, la dosificación de anticuerpo es iniciada generalmente aproximadamente a un día de inoculación del tumor y antes de que esté presente un tumor palpable. La capacidad de un anticuerpo para desarrollar exteriormente Rituxan® (es decir exhibir actividad antitumoral incrementada) en un modelo de etapas es una indicación fuerte de que el anticuerpo será más efectivo terapéuticamente que el Rituxan®. Más aun, en el modelo Daudi, anti-CD20, el objetivo para el Rituxan® se expresa sobre la superficie celular a un nivel mayor que es CD40.

Por "cantidad equivalente" el anticuerpo anti-CD40 de la invención y Rituxan® se pretende que la misma dosis mg sea administrada sobre una base por peso. Así, cuando el anticuerpo

000056

anti-CD40 de la invención es dosificado a 0.01 mg/kg de peso de cuerpo del ratón utilizado en el modelo de tumor, el Rituxan® también es dosificado a 0.001 mg/kg de peso de cuerpo del ratón. Similarmente, cuando el anticuerpo anti-CD40 de la invención es dosificado a 0.1, 1, o 10 mg/kg de peso de cuerpo de ratón utilizado en el modelo tumoral, también es dosificado el Rituxan® a 0.1, 1, o 10 mg/kg del peso de cuerpo de ratón.

Cuando se administra en el modelo tumoral de xeroinjerto de ratón desnudo, algunos anticuerpos de la invención dan como resultado un volumen de tumor significativamente menor que una cantidad equivalente de Rituxan®. Así, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal completamente humano CHIR 12.12 exhibe al menos un 20% de incremento en la actividad antitumoral con relación a aquel observado con una dosis equivalente de Rituxan® cuando se ensaya en el modelo de etapa de tumor de xeroinjerto de ratón desnudo utilizando la líneas celular de linfoma humano Daudi de la manera descrita en los ejemplos mostrados aquí adelante, y puede exhibir tanto como un 50% a 60% de incremento en la actividad antitumoral en este ensayo. Esta actividad antitumoral incrementada en la reducción mayor en el volumen del tumor observado con el anticuerpo anti-CD40 de la invención cuando se compara con la dosis equivalente de Rituxan®. Así, por ejemplo, dependiendo de la duración de tiempo después de la inoculación del tumor, el anticuerpo monoclonal CHIR 12.12 puede exhibir un volumen tumoral que es aproximadamente un tercio a aproximadamente la mitad del observado para una dosis equivalente de Rituxan®.

Otra diferencia en la eficacia del anticuerpo es medir in vitro la concentración del anticuerpo necesario para obtener la lisis máxima de las células tumorales in vitro en la presencia de células NK. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD40 de la invención alcanzan la lisis máxima de las células Daudi a un EC50 de menos de 1/2, y preferiblemente 1/4, y más preferiblemente 1/10 de la concentración de Rituxan®.

Además del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12, los otros anticuerpos anti-CD40 que compartirían las características de tener eficacia significativamente mayor que las cantidades equivalentes de Rituxan® en los ensayos descritos anteriormente incluyen, pero no están limitados a: (1) el anticuerpo monoclonal producido mediante la línea celular de hibridoma 12.12; (2) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste la secuencia mostrada en la ID de SEC No.: 2, la secuencia mostrada en la ID de SEC No.: 4, la secuencia mostrada en la ID de SEC No.: 5, ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 2 y ID de SEC No.: 4, y ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 2 y la ID de SEC No.: 5; (3) un anticuerpo monoclonal que tiene una secuencia de aminoácido codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de la secuencia de nucleótido mostrada en la ID de SEC No.: 1, la secuencia de nucleótido de la ID de SEC No.: 3, y ambas secuencias mostradas en las ID de SEC No.: 1 y en la ID de

000050

SEC No.: 3; (4) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal producido mediante la línea celular de hibridoma 12.12; (5) un anticuerpo monoclonal que se una a un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de aminoácido mostrada en la ID de SEC No.: 10 o la ID de SEC No.: 12; (6) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR 12.12 en el ensayo de unión competitivo; y (7) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento de unión de antígeno del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o de los anticuerpos monoclonales anteriores en los ítems precedentes (1)-(6), donde el fragmento retiene la capacidad de unir específicamente al antígeno CD40 humano.

Anticuerpos antagonistas Anti-CD40

Los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 representan anticuerpos antagonistas anti-CD40 adecuados para uso en los métodos de la presente invención. Los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 son anticuerpos monoclonales anti-CD40 completamente humanos del isotipo IgG1 producido de las líneas celulares de hibridoma mediante 131.2F8.5.9 (denominadas aquí como la línea celular 5.9) y 153.8E2.D10.D6.12.12 (denominada aquí como línea celular 12.12). Estas líneas celulares secretaron utilizando esplenocitos provenientes de ratones xenotípicos inmunizados que contiene el IgG1 humano, el locus de cadena pesada y el locus de cadena κ (Xenomouse® technology; Abgenix; Fremont, California). Las células de bazo fueron fusionadas con las células SP2/0 de

000053

mieloma de ratón (Sierra BioSource). Los hibridomas resultantes fueron subclonados varias veces para crear las líneas celulares monoclonales estables 5.90 y 12.12. otros anticuerpos de la invención pueden ser preparados similarmente utilizando transgénico de ratón para locus de inmunoglobulina humana o mediante otros métodos conocidos en la técnica o y/o descritos aquí.

Se describe el nucleótido y las secuencias de aminoácido de las regiones variables del anticuerpo CHIR-12.12, y la secuencia de aminoácido de las regiones variables del anticuerpo CHIR-5.9. Más particularmente, las secuencias de aminoácido para las regiones líder, variable y constante para la cadena ligera y la cadena pesada para mAb CHIR-12.12 se establecen en las figuras 9A y 9B, respectivamente. Ver también ID de SEC No.: 2 (secuencia completa para la cadena ligera del mAb CHIR-12.12), ID de SEC No.: 4 (secuencia completa para la cadena pesada para mAb CHIR-12.12), y ID de SEC No.: 5 (secuencia completa para una variante de la cadena pesada para mAb CHIR-12.12 establecida en la ID de SEC No.: 4, donde la variante comprende una sustitución de serina para el residuo alanina en la posición 153 de la ID de SEC No.: 4). Las secuencias de nucleótido que codifican la cadena pesada y la cadena ligera para el mAb CHIR-12.12 se establece en las figuras 11A y 11B, respectivamente. Ver también ID de SEC No.: 1 (secuencia codificante para la cadena ligera para el mAb CHIR-12.12), y ID de SEC No.: 3 (secuencia codificante para la cadena pesada para mAb CHIR-12.12)1 las secuencias de aminoácido para

las regiones líder, variable y constate para la cadena ligera y la cadena pesada de CHIR-5.9 mAb se establece en la figuras 10A y 10B, respectivamente. Ver también la ID de SEC No.: 6 (secuencia completa para la cadena ligera del mAb CHIR-5.9), ID de SEC No.: 7 (secuencia completa para la cadena pesada para mAb CHIR-5.9), y ID de SEC No.: 8 (secuencia completa para una variante de la cadena pesada del mAb CHIR-5.9 establecida en la ID de SEC No.: 7, donde la variante comprende una sustitución serina por el residuo alanina en la posición 158 de la ID de SEC No.: 7). Además, los hibridomas que expresan los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 han sido depositados con el ATCC con una designación de depósito de patente de PTA-5542 y PTA-5543, respectivamente.

Además de la actividad antagónica, es preferible que los anticuerpos anti-CD40 de esta invención tengan otro mecanismo de acción contra la célula tumoral. Por ejemplo, los anticuerpos nativos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 tienen actividad ADCC. Alternativamente, las regiones variables de los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 pueden ser expresadas sobre otro isotipo de anticuerpo que tenga actividad ADCC. También es posible conjugar las formas nativas, las formas recombinantes o los segmentos de unión de antígeno del CHIR-5.9 o CHIR-12.12 a una citotoxina, un agente terapéutico, o un ión de metal radioactivo o radioisótopo, como se anota aquí adelante.

Los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 se unen a CD40 soluble en los ensayos tipo ELISA, evitan la unión del

000001

ligando CD40 al CD40 de superficie celular, y desplazan el ligando CD40 preunido, como se determina mediante ensayos citométricos de flujo. Los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 compiten uno con el otro para unirse al CD40 pero no con el 15B8, el anticuerpo monoclonal anti-CD40 descrito en la Solicitud Provisional U.S. Serie No. 60/237,556, titulada "*Human Anti-CD40 Antibodies*" presentado en Octubre 2 del 2000, y la Solicitud Internacional PCT No. PCT/US01/30857, titulada también "*Human Anti-CD40 Antibodies*" presentada en Octubre 2, 2001 (Referencia de Abogado No.P16092.003), las cuales se incorporan ambas aquí como referencia en su totalidad. Cuando se ensaya in vitro para efectos sobre la proliferación de las células B provenientes de sujetos humanos normales, el CHIR-5.9 y CHIR-12.12 actúan como anticuerpos antagonistas anti-CD40. Además el CHIR-5.9 y CHIR-12.12 no incluyen fuerte proliferación de linfocitos humanos proveniente de sujetos normales. Estos anticuerpos son capaces matar CESL objetivo que expresan CD40 mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). La afinidad de unión del CHIR-5.9 por el CD40 humano es 1.2×10^{-8} M y la afinidad de unión del CHIR-12.12 es 5×10^{-10} M, determinado mediante el ensayo Biacore™.

Los anticuerpos antagonistas anti-CD40 adecuados para uso en los métodos de la presente invención exhiben una fuerte afinidad de unión de sitio simple para el antígeno de superficie celular CD40. Los anticuerpos monoclonales de la invención exhiben una constante de equilibrio de disociación (K_D) para CD40 de al menos

000062

10^{-5} M, al menos 3×10^{-5} M, preferiblemente al menos 10^{-6} M a 10^{-7} M, más preferiblemente al menos 10^{-8} M a aproximadamente 10^{-12} M, medido utilizando un ensayo estándar tal como el Biacore™. El análisis Biacore es conocido en la técnica y se suministra en detalles en "BIAapplications handbook". Los métodos descritos en la WO 01/27160 se pueden utilizar para modular la afinidad de unión.

Por "antígeno CD40", "antígeno de superficie celular", "receptor CD40" o "CD40" se significa una glicoproteína de transmembrana que pertenece a la familia del receptor de factor de necrosis tumoral (TNF) (ver, por ejemplo Patentes U.S. Nos. 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* (2d ed.; Academic Press, San Diego)). Dos isoformas de CD40 humano, codificadas por variantes de transcrito alternativamente empalmadas de este gen, se han identificado. La primer isoforma (también conocida como "isoforma larga" o "isoforma 1" se expresa como un polipéptido precursor del aminoácido 277 (ID de SEC No.: 12 (primero reportado como Acceso GenBank No. CAA43045, e identificado como isoforma 1 en el Acceso GenBank No. NP_001241) codificado por la ID de SEC No.: 11 (ver Acceso GenBank Nos. X60592 y NM_001250)), que tiene una secuencia de señal representada por los primeros 19 residuos. La segunda isoforma (también conocida como la "isoforma corta" o "isoforma 2" se expresa como un polipéptido precursor de aminoácido 203 (ID de SEC No.: 10 (Acceso GenBank No. NP_690593),

codificado por la ID de SEC No.: 9 (Acceso GenBank No.NM_152854)), que también tiene una secuencia de señal representada por los primeros 19 residuos. Los polipéptidos precursores de estas dos isoformas de CD40 humano comparten en común sus primeros 165 residuos (es decir residuos 1-165 de la ID de SEC No.: 10 y la ID de SEC No.: 12). El polipéptido precursor de la isoforma corta (mostrado en la ID de SEC No.: 10) se codifica mediante un variante transcrito (ID de SEC No.: 9) a la que le falta un segmento codificante, que conduce a un cambio de estructura de traducción; la isoforma CD40 resultante contiene un terminal C más corto y distinto (residuos 166-203 de la ID de SEC No.: 10) provenientes de aquel contenido de la isoforma larga del CD40 (terminal C mostrado en los residuos 166-277 de la ID de SEC No.: 12). Para los propósitos de la presente invención, el término "antígeno CD40", "antígeno de superficie celular CD40", "receptor CD40", o "CD40" comprende tanto las isoformas corta como larga del CD40. Los anticuerpos anti-CD40 de la presente invención se unen a un epítipo de CD40 humano que reside en el mismo sitio dentro de la isoforma corta o la isoforma larga de este antígeno de superficie celular como se anota aquí adelante.

El antígeno CD40 se despliega sobre una superficie de la variedad de tipos de célula, como se describe en cualquier parte aquí. Por "desplegado sobre la superficie" y "expresado sobre la superficie" se entiende que toda o una porción del antígeno se expone al exterior de la célula. El antígeno CD40 esperado expresado puede ser completa o parcialmente glicosilado.

000064

Por "actividad agonista" se entiende que la sustancia funciona como un agonista. Un agonista se combina con un receptor sobre una célula e inicia una reacción o actividad que es similar a o igual que aquella iniciada por el ligando natural del receptor-. Un agonista del CD40 induce cualquiera o todas, pero no limitadas las siguientes respuestas: proliferación y diferenciación de célula B, producción de anticuerpo, adhesión intercelular, generación de memoria de célula B, conmutación de isotipo, sobre regulación de expresión de célula de superficie de MHC clase II y CD80/86, y secreción de citocinas pro-inflamatorias tales como la IL-8, IL-12, y TNF. Por "actividad antagonista" se entiende que la sustancia funciona como un 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, particularmente CD40L. El antagonista puede reducir la inducción de uno cualquiera o más de las respuestas al agonista que se une con 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, preferiblemente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, más preferiblemente 70%, 80%, 85% y más preferiblemente 90%, 95%, 99%, o 100%. Los métodos para medir la especificidad y la actividad antagonista de unión del anticuerpo anti-CD40 y del ligando CD40 son conocidos por un experto en la técnica e inciden, pero no están limitados a, ensayos de unión competitivo estándar, ensayos para monitorear la secreción de inmunoglobulina mediante células B, ensayos de proliferación de célula B, ensayos de proliferación de célula B similar a Banchereau, ensayos de

000085

ayudantes de célula T para producción de anticuerpo, co-estimulación de ensayos de proliferación de célula B, y ensayos de sobre regulación de marcadores de activación de célula B. ver, por ejemplo, tales ensayos descritos en la WO/00/75348 y la Patente U.S. No. 6,087,329 incorporados aquí como referencia.

Por actividad agonista "significativa" se entiende una actividad agonista de al menos 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100% mayor que la actividad agonista inducida por una sustancia neutra o un control negativo medido en un ensayo de una respuesta de célula B. preferiblemente, actividad agonista "significativa" es una actividad agonista que es al menos dos veces mayor o al menos tres veces mayor que la actividad agonista inducida por una sustancia neutra o un control negativo medido en un ensayo de una respuesta de célula B. Así, por ejemplo, donde la respuesta a célula B de interés es proliferación de célula B la actividad agonista "significativa" sería la inducción de un nivel de proliferación de célula B que es al menos dos veces mayor o al menos tres veces mayor que el nivel de proliferación de célula B inducido por una sustancia neutra o un control negativo. En una modalidad, una inmunoglobulina no específica, por ejemplo IgG1, que no se une a CD40 sirve como control negativo. Una sustancia "libre de actividad agonista significativa" exhibiría una actividad agonista de no más de aproximadamente 25% mayor que la actividad agonista inducida por una sustancia neutra o un control negativo. Preferiblemente no más de aproximadamente 20% mayor, 15% mayor,

000066

10% mayor, 5% mayor, 1% mayor, 0.5% mayor, o aun no más de aproximadamente 0.1% mayor que la actividad agonista inducida por una sustancia neutra o un control negativo medido en un ensayo de una respuesta de célula B: los anticuerpos antagonistas anti-CD40 útiles en los métodos de la presente invención son libres de actividad agonista significativa como se anotó anteriormente cuando de unan a un antígeno CD40 sobre una célula human. En una modalidad de la invención, la actividad antagonista anti-CD40 es libre de actividad agonista significativa en una respuesta de célula B: en otra modalidad de la invención, el anticuerpo antagonista anti-CD40 está libre de actividad agonista significativa de ensayos de más de una respuesta de célula B (por ejemplo proliferación y diferenciación, o proliferación, diferenciación y producción de anticuerpos).

Como se utiliza aquí "anticuerpo anti-CD40" comprende cualquier anticuerpo que reconoce específicamente el antígeno de superficie de célula CD40 B que incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos de cadena simple y fragmentos de estos tales como Fab, F(ab')₂, Fv, y otros fragmentos que retiene la función de unión de antígeno del anticuerpo anti-CD40 padre. De particular interés a la presente invención son los anticuerpos antagonistas anti-CD40 descritos aquí que comparten las características de unión de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos anteriormente. Tales anticuerpos incluyen, pero no están limitados a los siguientes: (1) los anticuerpos monoclonales

producidos mediante las líneas celulares de hibridoma designadas 131.2F8.5.9 (denominadas aquí como línea celular 5.9) y la 153.8E2.D10.D6.12.12 (denominada aquí como línea celular 12.12), depositada con el ATCC como Depósito de Patente No. PTA-5542 y Depósito de Patente PTA-5543, respectivamente; (2) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la secuencia mostrada en la ID de SEC No.: 2, la secuencia mostrada en la ID de SEC No.: 4, la secuencia mostrada en la ID de SEC No.: 5, ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 2 y la ID de SEC No.: 4, y ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 2 y la ID de SEC No.: 5; (3) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de la secuencia mostrada en la ID de SEC No.: 6, la secuencia mostrada en la ID de SEC No.: 7, la secuencia mostrada en la ID de SEC No.: 8, ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 6 y la ID de SEC No.: 7, y ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 6 y la ID de SEC No.: 8; (4) un anticuerpo monoclonal que tiene una secuencia de aminoácido codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de la secuencia de nucleótido mostrada en la ID de SEC No.: 1, la secuencia de nucleótido mostrada en la ID de SEC No.: 3, y ambas secuencias mostradas en las ID de SEC No.: 1 y en la ID de SEC No.: 3; (5) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unir al anticuerpo monoclonal producido mediante la línea celular de hibridoma 5.9 o la línea celular de hibridoma 12.12; (6) un anticuerpo monoclonal que se une a un

000303

epítopo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de aminoácido mostrada en la ID de SEC No.: 10 o la ID de SEC No.: 12; (7) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR 12.12 en un ensayo de unión competitivo; y (8) un anticuerpo monoclonal de un fragmento que se une a antígeno del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 de los anticuerpos monoclonales anteriores en los ítems precedentes (1)-(7), donde el fragmento retiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno CD40 humano.

Producción de Anticuerpos Antagonistas Anti-CD40

Los anticuerpos antagonistas anti-CD40 descritos aquí y para uso en los métodos de la presente invención se pueden producir utilizando cualquier método de producción de anticuerpo conocido por aquellos expertos en la técnica. Así, el suero policlonal se puede preparar mediante métodos convencionales. En general, una solución que contiene el antagonista CD40 es utilizada primero para inmunizar un animal adecuado, preferiblemente un ratón, rata, conejo, o cabra. Los conejos o las cabras son los preferidos para la preparación de suero policlonal debido al volumen de suero obtenible, y a la disponibilidad de anticuerpos anti-conejo y anti-cabra marcados.

El suero policlonal se puede prepara en un animal transgénico, preferiblemente un ratón que lleva locus de inmunoglobulina. En una modalidad preferida, las células Sf9 que

000000

expresan CD40 son utilizadas como el inmunógeno. La inmunización se puede desarrollar al mezclar o emulsificar la solución que contiene antígeno en solución salina, preferiblemente en un adyuvante tal como el adyuvante completo de Freund, e inyectar la mezcla o emulsión parenteralmente (generalmente de manera subcutánea o intramuscular). Una dosis de 50-200 µg/inyección es típicamente suficiente. La inmunización es generalmente reforzada 2-6 semanas más tarde con una o más inyecciones de la proteína en solución salina, preferiblemente utilizando adyuvante incompleto de Freund. Uno puede general alternativamente anticuerpos mediante inmunización in vitro utilizando los métodos conocidos en la técnica, el cual para los propósitos de esta invención se considera equivalente a inmunización in vivo. Los antisueros policlonales son obtenidos al hacer sangrar el animal inmunizado en un recipiente de vidrio o plástico, incubando la sangre a 25° C durante 1 hora, seguido por incubación a 4° C durante 2-18 horas. El suero se recupera mediante centrifugación (1,000 x g durante 10 minutos). Aproximadamente 20-50 ml por sangrado se puede obtener de conejos.

La producción de células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) se describe en la Patente U.S. No. 6,004,552, incorporada aquí como referencia. El resumen, las secuencias que codifican CD40 humano, se recombinaron en báculo virus que utiliza vectores de transferencia. Los plásmidos se co-transfectan con ADN de báculo virus tipo silvestre en células Sf9. Las células Sf9 infectadas

000370

con báculo virus recombinante son identificada y purificada clonalmente.

Preferiblemente el anticuerpo es de naturaleza monoclonal. Por "anticuerpo monoclonal" se entiende un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos substancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de ocurrencia natural que puedan estar presentes en menores cantidades. El término no está limitado en relación con las especies o fuente del anticuerpo. El término comprende inmunoglobulinas completas así como también fragmentos como anticuerpos de cadena simple y fragmentos de estos tales como Fab, F(ab')₂, Fv, y otros que retiene la función de unión de antígeno del anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un sitio antigénico simple, es decir, el antígeno de superficie de célula CD40 en la presente invención. Adicionalmente, como contraste a las preparaciones de anticuerpo convencionales (policlonales) que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un determinante simple sobre el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como siendo obtenido de una población substancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe ser considerado como producción que se requiera del anticuerpo mediante cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a ser utilizados de acuerdo con la

presente invención se pueden hacer mediante el método de hibridoma primero descrito por Kohler et al. (1975) *Nature* 256: 495, o se pueden hacer mediante métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, Patente U. S. No. 4,816,567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de librerías de anticuerpo de fago que utiliza las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson et al. (1991) *Nature* 352: 624-628; Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581-597; y Patente U.S: No. 5, 548

Por "epítopo" se entiende la parte de una molécula antigénica para la cual es producido un anticuerpo y a la cual el anticuerpo se unirá. Los epítomos pueden comprender residuos de aminoácido lineal (es decir, los residuos dentro del epítopo son dispuestos secuencialmente uno después del otro en una forma lineal), los residuos de aminoácidos no lineal (denominados aquí, "epítomos no lineales"; aquellos epítomos que no están dispuestos secuencialmente), o ambos residuos de aminoácido lineal y no lineal.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando el método de Kohler et al. (1975) *Nature* 256: 495-496, o una modificación de estos. Típicamente, un ratón se inmuniza con una solución que contiene un antígeno. La inmunización se puede desarrollar o emulsificar la solución que contiene antígeno en solución salina, preferiblemente en un adyuvante tal como el adyuvante completo de Freund, e inyectar la mezcla o emulsión parenteralmente. Cualquier método de inmunización conocido en la

000072

técnica se puede utilizar para obtener los anticuerpos monoclonales de la invención. Después de la inmunización del animal, el bazo (y opcionalmente, varios nodos de linfa grande) son removidos y disociados en células simples. Las células de bazo se pueden seleccionar al aplicar una suspensión de célula a un plato o bien recubierto con el antígeno de interés. Las células B que expresan inmunoglobulina unida a membrana específica para el antígeno unida al plato no son enjuagados. Las células B resultantes o todas las células de bazo disociadas, son entonces inducidas a fusionarse con células de mieloma para formar hibridomas, y son cultivadas en un medio selectivo. Las células resultantes son plateadas mediante difusión en serie y son ensayadas para la producción de anticuerpos que se unan específicamente al antígeno de interés (y que no se unen a antígenos no relacionados). El anticuerpo monoclonal seleccionado (mAb)- que secreta hibridomas son entonces cultivados o in vitro (por ejemplo en botellas de cultivo de tejido o reactores de fibra hueca), o in vivo (como ascitis en ratones).

Donde los anticuerpos antagonistas anti-CD40 de la invención son preparados utilizando métodos de ADN recombinante, el ADN que codifica los anticuerpos monoclonales son fácilmente aislados y secuenciados utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo al utilizar sondas de oligonucleótido que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos de murino). Las células de hibridoma descritas aquí sirven como una fuente preferida de tal ADN. Un

000073

vez aislado, el ADN puede ser ubicado en vectores de expresión, y son entonces transfectados en células huéspedes tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de Ovario de Hámster Chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otra forma proteína de /inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huéspedes recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifican el anticuerpo incluyen Skerra et al (1993) *Curr. Opinión in Immunol*, 5: 256 y Pihickthun (1992) *Immunol. Revs.* 130:151. Alternativamente, se puede producir en una línea celular tal como una línea celular CHO como se describe en las Patentes U.S. Nos. 5,54,403; 5,545,405; y 5,988,144; incorporada aquí como referencia. En resumen la línea celular es transfectada con vectores capaces de expresar una cadena ligera y una cadena pesada, respectivamente. Al transfectar las dos proteínas sobre vectores separados, se pueden producir los anticuerpos quiméricos. Otra ventaja de la glicosilación correcta del anticuerpo.

En algunas modalidades, el anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o el fragmento que se une a antígeno de este es producido en células CHO que utilizan el sistema de expresión de gen Gs (Lonza Biologics, Portsmouth, New Hampshire), el cual utiliza glutamina sintasa como un marcador. Ver, también Patentes U.S. Nos. 5,122,464; 5,591,639; 5,658,759; 5,770,359; 5,827,739; 5,879,936; 5,891,

000374

693; y 5,981,216; cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Los anticuerpos monoclonales al CD40 son conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, las escoñes indicadas al antígeno de célula B en McMichael, ed. (1987; 1989) *Leukocyte Typing III and IV* (Oxford University Press, New York); Patente U.S. Nos. 5,674,492; 5,874,082; 5,677,165; 6,056,959 WO 00/63395; Publicación Internacional Nos. 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; todos los cuales se incorporan aquí como referencia. De particular interés a la presente invención son los anticuerpos antagonistas anti-CD40 descritos aquí que comparten las características de unión de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos anteriormente.

El término "epítipo de antígeno CD40" como se utiliza aquí se refiere a una molécula que es capaz de inmunoreactividad con los anticuerpos monoclonales anti-CD40 de la invención, que excluyen el antígeno CD40 mismo. Los epítipos de antígeno CD40 pueden comprender proteínas, fragmentos de proteína, péptidos,

000000

carbohidratos, lípidos y otras moléculas, pero para los propósitos de la presente invención son más comúnmente proteínas, oligopéptidos cortos, semejantes de oligopéptido (es decir compuestos orgánicos que semejan las propiedades de unión a anticuerpo del antígeno CD40) o combinaciones de estos. Los semejantes a oligopéptido adecuados son descritos, inter alia, en la solicitud PC TUS 91/04282.

Adicionalmente, el término "anticuerpo anti-CD40" como se utiliza aquí comprende anticuerpos anti-CD40 quiméricos; tales anticuerpos anti-CD40 quiméricos para uso en los métodos de la invención tiene las características de unión de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos aquí. Por anticuerpos "quiméricos" se entiende anticuerpos que son más preferiblemente derivados utilizando técnicas de ácido desoxiribonucleico recombinantes y que comprenden tanto los componentes humanos (incluyendo especie inmunológicamente "relacionadas", por ejemplo chimpancés) y no humanos. Así, la región constante del anticuerpo quimérico es más preferiblemente substancialmente idéntica a la región constante de un anticuerpo humano natural; la región variable del anticuerpo quimérico es más preferiblemente derivada de una fuente no human y tiene la especificidad antigénica deseada al antígeno de célula de superficie CD40. La fuente no humana puede ser cualquier fuente de vertebrado que se pueda utilizar anticuerpo para generar anticuerpos al antígeno de superficie celular CD40 humano o material que comprende un antagonista de superficie celular CD40

humano. Tales fuentes no humanas incluyen, pero no están limitadas a, roedores (por ejemplo conejo, rata, ratón, etc.); ver, por ejemplo, Patente U.S. No. 4,816,567, incorporada aquí como referencia) y primates no humanos (por ejemplo, Old World Monkey, simio, etc.; ver, por ejemplo, Patente U.S. Nos. 5,750,105 y 5,756,096; incorporada aquí como referencia). Como se utiliza aquí, la frase "inmunológicamente activo" cuando se utiliza en referencia a anticuerpos anti-CD40 quiméricos significa un anticuerpo quimérico que se une a CD40 humano.

Los anticuerpos anti-CD40 quiméricos y humanizados también están comprendidos por el término anticuerpo anti-CD40 como se utiliza aquí. Los anticuerpos quiméricos comprenden segmentos de anticuerpos derivados de especies diferentes. Rituxan® es un ejemplo de un anticuerpo quimérico con una región variable de murino y una región constante de humano.

Por "humanizado" se entienden formas de anticuerpo anti-CD40 que contienen secuencia mínima derivada de secuencias de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en el cual los residuos provenientes de una región hipervariable (también conocida como región determinante de complementariedad o CDR) del receptor son reemplazados por residuos provenientes de una región hipervariable de especies no humanas (anticuerpo donados) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene cualquier especificidad, afinidad y capacidad deseadas. La

frase "región determinante de complementariedad" se refiere a una secuencia de aminoácido que define junto la afinidad de unión y la especificidad de la región Fv natural de un sitio de unión de inmunoglobulina nativo, ver, por ejemplo, Chothia et al (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917; Kabat et al (1991) U. S. Dept. of Health and Human Services, NIH Publicación No. 91-3242). La frase "región constante" se refiere a la porción de la molécula de anticuerpo que le confiere funciones efectivas. En trabajo previo dirigido hacia producir anticuerpos no inmunogénicos para uso en terapia de enfermedad de humano, las regiones constantes de ratón se sustituyeron por regiones constantes humanas. Las regiones constantes de los anticuerpos humanizados objeto se derivan de inmunoglobulinas humanas. Sin embargo, estos anticuerpos humanizados aun elicitaban una respuesta inmune no deseada y potencialmente peligrosa en humanos y teniendo pérdida de afinidad. Los anticuerpos anti-CD40 humanizados para uso en los métodos de la presente invención tienen características de unión similares a aquellas exhibidas por los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos aquí.

La humanización puede ser esencialmente desarrollada siguiendo el método de Winter y co-inventores (Jones et al. (1986) *Nature* 321: 522-525; et al. (1988) *Nature* 332: 323-327; Verhoeyen et al. (1988) *Science* 239: 1534-1536), mediante la sustitución las secuencias CDRs o CDR de roedor o roedor mutante para las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Ver también Patente U.S. Nos. 5,225,539; 5,585,089; 5,693,761;

000078

5,693,762; 5,859,205; incorporada aquí como referencia. En algunos casos, los residuos dentro de las regiones de estructura de una o más regiones variables de inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes residuos no humanos (ver, por ejemplo, Patente U.S. Nos. 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; y 6,180,370). Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones son hechas para refinar adicionalmente el desempeño del anticuerpo (por ejemplo para obtener la afinidad deseada). En general, el anticuerpo humanizado comprenderá substancialmente todo o al menos uno, y típicamente dos, dominios de variable, en los cuales substancialmente todas las regiones hipervariables corresponden a aquellas de inmunoglobulina no humana y todas o substancialmente todas las regiones de estructura de aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también opcionalmente comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente que de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales ver Jones et al. (1986) *Nature* 331: 522-525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332: 323-329; and Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596; incorporada aquí como referencia. De acuerdo con esto, tales anticuerpos "humanizados" pueden incluir anticuerpos en donde substancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de especies no humanos. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los cuales algunos de los

residuos CDR y posiblemente todos los residuos de estructura son sustituidos por residuos provenientes de sitios análogos en anticuerpo de roedor. Ver, por ejemplo, Patente U.S. Nos. 5,225,539; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; 5,859,205. Ver también Patente U.S. No. 6,180,370, y la Publicación Internacional WO 01/27160, donde son descritos anticuerpos humanizados y las técnicas para producir anticuerpos humanizados habiendo mejorado la afinidad para un antígeno predeterminado.

Todo lo comprendido por el término anticuerpos anti-CD40 son xenogénicos o anticuerpos anti-CD40 modificados producidos en un huésped mamífero no humano, más particularmente un ratón transgénico, caracterizado por los locus de inmunoglobulina endógena inactivada (Ig). En tales animales transgénicos, los genes endógenos competentes para la expresión de subunidades ligera y pesada de inmunoglobulinas huéspedes son hechos no funcionales y sustituidos con los locus de inmunoglobulina humana análoga. Estos animales transgénicos producen anticuerpos humanos en la ausencia substancial de subunidades de inmunoglobulina huésped pesada o ligera ver , por ejemplo, Patente U.S. Nos. 5,877,397 Y 5,939, 598, incorporada aquí como referencia.

Preferiblemente, los anticuerpos humanos completos al CD40 son obtenidos al inmunizar ratones transgénicos. Uno de tales ratones se obtiene de la tecnología XenoMouse® (Abgenix; Fremont, California), y se describe en la Patente U.S. Nos. 6,075,181, 6,091,001, y 6,114,598, todas las cuales se incorporan aquí como

000380

referencia. Para producir los anticuerpos descritos aquí, los ratones transgénicos para locus de cadena pesada IgG1 de humano y locus de cadena ligera κ humano se inmunizaron con células Sf9 que expresan CD40 humano. Los ratones también pueden ser transgénicos para otros isotipos. Los anticuerpos completamente humanos útiles en los métodos de la presente invención se caracterizan por propiedades de unión similares a aquellas exhibidas por los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos aquí.

Los fragmentos de los anticuerpos anti-CD40 son adecuados para uso en los métodos de la invención en tanto que ellos retengan la afinidad deseada del anticuerpo de longitud completa. Así un fragmento de anticuerpo anti-CD40 retendrá la capacidad de unirse al antígeno de superficie de célula CD40 B. tales fragmentos se caracterizan por propiedades similares al anticuerpo antagonista anti-CD40 de longitud completa correspondiente, esto es los fragmentos se unirán específicamente a un antígeno CD40 humano expresado sobre la superficie de una célula humana, y son libres de actividad agonista significativa pero exhiben actividad antagonista cuando se unen a un antígeno CD40 sobre una célula que expresa CD40 humano. Tales fragmentos son denominados aquí como fragmentos "de unión de anticuerpo".

Los fragmentos de unión de antagonista adecuados de un anticuerpo comprenden una porción del anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión de antígeno o variable

000???

de esta. Ejemplos de fragmento de anticuerpo incluyen, pero no están limitados a, Fab, $F(ab')_2$, y fragmentos Fv y moléculas de anticuerpo de cadena simple. Por "Fab" se entiende un fragmento de unión de antagonista monovalente de una inmunoglobulina que está comprendido de una cadena ligera y parte de una cadena pesada. Por " $f(ab')_2$ " se entiende un fragmento de unión de antígeno bivalente de una inmunoglobulina que contiene tanto cadenas ligeras como parte de ambas cadenas pesadas. Por "Fv de cadena simple" o fragmentos de anticuerpo "sFv" se entiende fragmentos que comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una cadena de polipéptido simple. Ver, por ejemplo, Patente U.S. Nos. 4,946,778, 5,260,203, 5,455,030, y 5,856,456, incorporada aquí como referencia. De manera general, el polipéptido Fv comprende además un ligador de polipéptido entre los dominios V_H y V_L que le posibilitan al sFv formar la estructura deseada para la unión de antígeno. Para una revisión del sFv ver Pluckthun (1994) in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, ed. Rosenberg and Moore (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315. Los fragmentos de unión de anticuerpo de antígeno de los anticuerpos antagonista anti-CD40 descritos aquí también pueden ser conjugados a una citotoxina para efectuar la muerte de las células de cáncer objetivo, como se describen aquí adelante.

Los anticuerpos o los fragmentos de a pueden ser aislados de librerías de fago de anticuerpo generado utilizando las técnicas descritas en, por ejemplo, McCafferty et al. (1990) *Nature* 348:

000000

552-554 (1990) y Patente U.S. 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 de murino y humano, respectivamente, utilizando librerías de fago. Las publicaciones subsecuentes describen al producción fórmula anticuerpos humanos de alta afinidad (rango nM) mediante mezcla de cadena (Marks et al. (1992) *Bio/Technology* 10: 779-783), así como también infección combinatoria y recombinación in vivo como una estrategia para la construi librerías de fago muy grandes (Waterhouse et al. (1993) *Nucleic. Acids Res.* 21: 2265-2266). Así, estas técnicas son alternativas viables a técnicas de hibridoma de anticuerpo monoclonal tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

Han sido desarrolladas varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron por vía de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (ver, por ejemplo, Morimoto et al. (1992) *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992) and Brennan et al. (1985) *Science* 229:81). Sin, embargo, estos fragmentos pueden ser ahora producidos directamente mediante células huésped recombinantes, por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden ser aislados de las librerías de fago de anticuerpo discutidas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden ser recuperado directamente de *E. coli* y acoplados químicamente para formar fragmentos F(Ab')₂ (Carter et al. (1992) *BiolTechnology* 10: 163-167). De acuerdo con otra

000183

aproximadamente, los fragmentos $F(ab')_2$ se pueden aislar directamente del cultivo de célula huésped recombinante. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el practicante experto.

Los anticuerpos antagonistas anti-CD40 útiles en los métodos de la presente invención incluyen los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos aquí así como también los anticuerpos que difieren de este anticuerpo pero permanecen los CDR; y los anticuerpos con una o más adición(s), supresión(s) o sustitución(s) de aminoácido, en donde la actividad antagonista se mide mediante la inhibición de proliferación y/o diferenciación de célula B. la invención también comprende anticuerpos antagonistas anti-CD40 desinmunizados, que pueden ser producidos como se describe en, por ejemplo, la Publicaciones Internacionales No. WO 98/52976 y WO 0034317; incorporada aquí como referencia. De esta manera, los residuos dentro de los anticuerpos antagonistas anti-CD40 de la invención se modifican con el fin de hacer los anticuerpos no o menos inmunogénicos a humanos aunque reteniendo su actividad antagonista hacia las células que expresan CD40, en donde tal actividad se mide mediante los ensayos anotados en cualquier parte aquí. También se incluye dentro del alcance de las reivindicaciones las proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo antagonista anti-CD40 de la invención o fragmentos de estos, cuyas proteínas de fusión se pueden sintetizar o expresar de los vectores de polinucleótido correspondientes, como son conocidos en la técnica. Tales

proteínas de fusión se describen con referencia a la conjugación de anticuerpos como se anota adelante.

Los anticuerpos de la presente invención pueden tener variaciones de secuencia producidas utilizando los métodos descritos en la Solicitud de patente No. EP 0983303A1 WO 00/34317, y WO 98/52976, incorporada aquí como referencia. Por ejemplo., se ha mostrado que las secuencias dentro del CDR pueden cuasar que un anticuerpo se una al MHC clase II y dispara una respuesta de célula T ayudante que no se quiere. Una sustitución conservadora puede permitirle al anticuerpo retener la actividad de unión a un perdiendo su capacidad para disparar una respuesta de célula T no querida. Cualquiera de tales sustituciones conservadoras y no conservadoras puede ser hecha utilizando métodos reconocidos en la técnica, tales como aquellos anotados en cualquier parte aquí y los anticuerpos resultantes caerán dentro del alcance de la invención. Los anticuerpos variantes pueden ser rutinariamente ensayados para actividad antagonista, afinidad, y especificidad utilizando los métodos descritos aquí.

Un anticuerpo producido mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente, o cualquier otro método no descrito aquí, caerá dentro del alcance de la invención si este posee al menos una de las siguientes actividades biológicas: inhibición de secreción de inmunoglobulina mediante células B periféricas humanas normales estimuladas por las células T; inhibición de supervivencia y/o proliferación de células B periféricas humanas

000385

normales estimuladas por células T Jurkat; inhibición de supervivencia y/o proliferación de células B periféricas humanas normales estimuladas por células que expresan CD40L o ligando CD40 soluble (sCD40L); inhibición de señales intracelulares anti-apoptosicas "supervivencia" en cualquier célula estimulada por sCD40L o CD40L de fase sólida; inhibición de la traducción de la señal CD40 en cualquier célula luego de ligado con sCD40L o CD40L de fase sólida; e inhibición de proliferación de células B malignas humanas como se anota adelante. Estos ensayos se pueden desarrollar como se describe en los ejemplos presentados aquí. Ver también ensayos descritos en Schultze et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 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 Patente U.S. Nos. 5,674,492 y 5,847,082; incorporado aquí como referencia.

Un ensayo representativo para detectar los anticuerpos antagonistas anti-CD40 específicos para los epítomos de antígeno CD40 identificados aquí es un "ensayo de unión competitivo". Los ensayos de unión competitivos son ensayos sexológicos en los cuales los desconocidos son detectado y cuantificados por su capacidad para inhibir la unión de un ligando conocido marcado a su anticuerpo específico. Esto también como un ensayo de inhibición competitiva. En un ensayo de unión competitiva

representativo, el polipéptido CD40 marcado es precipitado por anticuerpos candidato en una muestra, por ejemplo, en combinación con anticuerpos monoclonales levantados contra uno o más epítopos de los anticuerpos monoclonales de la invención. Los anticuerpo anti-CD40 que reaccionan específicamente con un epítipo de interés se pueden identificar al seleccionar una serie de anticuerpos preparados contra una proteína o fragmento CD40 de la proteína que comprende el epítipo particular de la proteína de interés CD40. Por ejemplo, los epítopos de interés CD40 humanos incluyen epítopos que comprende residuos de aminoácidos lineales y/o no lineales de la forma corta del CD40 humano (ver Acceso GenBank No NP_690593), establecido en la figura 12B (ID de SEC No.: 10) codificado mediante la secuencia establecida en la figura 12A (ID de SEC No.: 9, ver también Acceso GenBank No. NP_152854), o de la isoforma larga del CD40 humano (ver Acceso GenBank Nos. CAAA43045 y NP_001241), codificado mediante la secuencia establecida en la figura 12C (ID de SEC No.: 11 ver Acceso GenBank No. X60592 y NP_001250). Alternativamente, los ensayos de unión competitiva con anticuerpos antagonistas anti-CD40 estables previamente identificados se pueden utilizar para seleccionar los anticuerpos monoclonales comparables con los anticuerpos previamente identificados.

Los anticuerpos empleados en tales inmunoensayos se pueden marcar o no marcar. Los anticuerpos no marcados se pueden emplear en aglutinación; los anticuerpos marcados se pueden emplear en una amplia variedad de ensayos, que emplean una amplia variedad

000087

de marcas. La detección de la formación de un complejo de anticuerpo antígeno entre un anticuerpo anti-CD40 y un epítipo de interés se puede facilitar al unir una sustancia detectable al anticuerpo. Los medios de detección adecuados incluyen el uso de marcas tales como radionuclidos, enzimas, coenzimas, fluorescentes, quimioluminiscentes, cromógenos, sustrato de enzima y cofactores, inhibidores de enzima, complejos de grupo prostético, radicales libres, partículas, tintes, y similares. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de cola de caballo, álcali fosfatasa, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes incluyen umbeliferona, fluorescina, fluorescein isotiocianato, rodamina, diclorotriazinilamina fluorescina, Cloruro de dansil o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente es luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequarina; y ejemplos de materiales radioactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , o ^3H . Tales reactivos marcados se pueden utilizar en una variedad de ensayos bien conocidos, tales como radioinmunoensayo de enzima, por ejemplo, ELISA, inmunoensayos fluorescentes, y similares. Ver por ejemplo Patente U.S. Nos. 3,766,162, 3,791,932; 3,817,837; y 4,233,402.

Cualquiera de los anticuerpos antagonistas anti-CD40 previamente descritos o los fragmentos de anticuerpo de esto se pueden conjugar antes del uso en los métodos de la presente

000788

invención. Los métodos para producir los anticuerpos conjugados son conocidos en la técnica. Así, el anticuerpo anti-CD40 se puede marcar utilizando una marcación indirecta a una aproximación de marcación indirecta. Por "marcación indirecta" o "aproximación de marcación indirecta" entiende que el agente quelante está covalentemente unido a un anticuerpo y al menos se inserta un radionuclido en el agente quelante. Ver, por ejemplo, los agentes quelantes y los radionuclidos descritos en Srivagtava y Mease (1991) *Nucl. Med. Bio.* 18: 589-603, incorporada aquí como referencia los marcadores adecuados incluyen fluoróforos, cromóforos, átomos radioactivos (particularmente ^{32}P y ^{125}I), reactivos densos en electrones, enzimas, y ligandos que tiene compañeros de unión específicos. Las enzimas son típicamente detectadas por su actividad. Por ejemplo la peroxidasa de cola de caballo es usualmente detectada por su capacidad para convertir 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) a un pigmento azul cuantificable con un espectrofotómetro. "Compañero de unión específico" se refiere a una proteína capaz de unir una molécula de ligando con alta especificada, como por ejemplo en el caso de un antígeno y un anticuerpo monoclonal específico para este. Otros compañeros de unión específicos incluyen biotina y avidina o estreptavidina, IgG y proteína A, y numerosos acoples receptor-ligando conocidos en la técnica. Se debe entender que la descripción anterior no pretende categorizar los varios marcadores en distintas clases, en razón a que la misma marca puede servir de varios de diferentes modos. Por ejemplo el ^{125}I puede servir como marcador radioactivo o como un reactivo denso

000000

de electrón. El HRP puede servir como una célula o como un antígeno para mAb. Adicionalmente uno puede combinar varios marcador es para un efecto deseado. Por ejemplo, el mAbs y la avidina también requieren marcadores en la práctica de esta invención: así, uno podría marcar aMb con biotina y detectar su presencia con avidina marcada con ^{125}I , o con una anti-biotina mAb marcada con HRP. Otras permutaciones y posibilidades serán fácilmente evidentes para aquellos expertos en la técnica, y son consideradas como equivalentes dentro del alcance de la presente invención.

Alternativamente, el anticuerpo anti-CD40 se puede marcar utilizando "marcación directa" o una "aproximación demarcación directa", donde el radionuclido está covalentemente unido directamente a un anticuerpo (típicamente por vía de un residuo de aminoácidos). Los radionuclidos preferidos se suministran en Srivagtava y Mease (1991) *supra*. La aproximación de marcación indirectas particularmente preferida. Ver también, por ejemplo, Publicaciones Internacionales Nos WO 00/52031 y WO 00/52473, donde se utiliza el ligador para unir un marcador radioactivo a los anticuerpos; y las formas marcadas de anticuerpo anti-CD40 descritas en la Patente U.S No.: 6,015,542; incorporada aquí como referencia.

Además, se puede conjugar un anticuerpo (o fragmento de este) a una porción terapéutica tal como citotoxina, un agente terapéutico, o un Ion de metal radiactivo o tradioisótopo. Una

000000

citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es dañino para las células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasin B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colquicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaina, tetracaina, lidocaina, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de estos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no están limitados a, antimetabolitos (por ejemplo metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalan, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfan, dibromomannitol, estreptozotocina, mitomicina C, and cis-diclorodiamina platina (II)(DDP) cisplatina), y antraciclinas (por ejemplo daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y agentes anti-mitóticos (por ejemplo vincristina y vinblastina). Los radioisótopos incluyen pero no están limitados a, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, Bi-213Pd-109, TC-99, In-111, y similares. Los conjugados de la invención se pueden utilizar para modificar las respuestas biológicas dadas; la porción de droga no está construida como limitada a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la porción de droga puede ser una proteína o un polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales

000111

proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricin A, exotoxina de pseudomonas, o toxina de difteria; una proteína tal como factor de necrosis celular, interferón-alfa, interferón-beta, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaqueta, actividad deplasminógeno de tejido, o, modificadores de respuesta biológica tales como, linfoquina, interleucina -1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6") factor estimulante de colonia de macrófago de granulocito ("GM-CSF"), factor estimulante de colonia de granulocito ("GM-CSF"), u otros factores.

Las técnicas para conjugar tales porciones terapéuticas a anticuerpos son bien conocidas. Ver, por ejemplo, Arron et al. (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy" in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, ed. Reisfeld et al. (Alan R. Liss, Inc.) pp. 243-256; Hellstrom et al. (1987) "Antibodies for Drug Delivery" in *Controlled Drug Delivery*, ed Robinson et al. (2d ed; Marcel Dekker, Inc.), pp. 623-653; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies'84: Biological and Clinical Applications*, ed. Pinchera et al. pp. 475-506 (Editrice Kurtis, Milano, Italy, 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, ed. Baldwin et al. (Academic Press, New York 1985), pp. 303-316; and Thorpe et al. (1982) *Immunol. Rev.* 62: 119-158.

000252

Alternativamente, un anticuerpo se puede conjugar a un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo como se describe en la Patente U.S. No. 4,676,980. Además, se pueden utilizar ligadores entre las marcas y los anticuerpos de la invención (ver Patente U.S. No: 4,831,175). Los anticuerpos o, los fragmento de unión de antígeno estos pueden estar directamente marcados con yoduro radioactivo, indio, itrio, u otra partícula radiactiva conocida en la técnica (Patente U.S. No. 5,595,721). El tratamiento puede consistir de una combinación de tratamientos con anticuerpos conjugados y no conjugados administrados simultanea o subsecuentemente (WO 00/52031 y WO 00/52473).

Variantes de Anticuerpos Antagonistas Anti-CD40

Los variantes biológicamente activos adecuados de los anticuerpos anti-CD40 antagonistas se pueden utilizar en los métodos de la presente invención. Tales variantes retendrán las propiedades de unión deseadas del anticuerpo antagonista anti-CD40 padre. Los métodos para hacer las variantes del anticuerpo están generalmente disponibles en la técnica.

Por ejemplo, las variantes de la secuencia de aminoácido de un anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 descrito aquí, se puede prepara mediante mutaciones en la secuencia de ADN clonado que codifica

000093

el anticuerpo de interés. Los métodos para mutagénesis y alteraciones de secuencia de nucleótido son bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Walker y Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York); Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488-492; Kunkel et al. (1987) *Methods Enzymol* 154: 367-382; Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, New York); Patente U. S. No. 4,873,192; y las referencias citadas aquí; incorporadas aquí como referencia. Guía para sustituciones de aminoácido apropiadas que no afectan la actividad biológica del polipéptido de interés se pueden encontrar en el modelo de Dayhoff et al. (1978) in *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D. C.), incorporada aquí como referencia. Las sustituciones conservadoras tales como el intercambio de un aminoácido con otras que tengan propiedades similares, puede ser preferida. Ejemplos de sustituciones conservadoras incluye, pero no están limitadas a, Gly $\leftrightarrow$ Ala, Val $\leftrightarrow$ Ile $\leftrightarrow$ Leu, Asp $\leftrightarrow$ Glu, Lys $\leftrightarrow$ Argg, Asn $\leftrightarrow$ Gln, y Phe $\leftrightarrow$ TRp $\leftrightarrow$ Tyr.

Para construir variantes del polipéptido del anticuerpo antagonista anti-CD40 de interés, se hacen modificaciones de tal forma que las variantes continúen poseyendo la actividad deseada, es decir, afinidad de unión similar y sean capaces de unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expresado sobre la superficie de una célula humana, y que es libre de actividad agonista significativa pero que exhibe actividad antagonista

000094

cuando se une a un antígeno CD40 sobre una célula que expresa CD40 humano. Obviamente, cualquiera mutaciones hechas en el ADN que codifica el polipéptido variante no deben ubicar la secuencia por fuera del marco de lectura y preferiblemente no crearan regiones complementarias que pudieran producir una estructura de mRNA secundario. Ver Publicación de Solicitud de Patente EP No. 75,444.

Además, la región constante del anticuerpo antagonista anti-CD40 se puede mutar para alterar la función efectuada de numerosas maneras. Por ejemplo, ver la Patente U.S. 6,737,056B1 y la Publicación de la Solicitud de Patente No. 2004/0132101A1, que describen mutaciones Fc que optimizan la unión de anticuerpos a los receptores Fc.

Preferiblemente, las variantes de un anticuerpo antagonista anti-CD40 de referencia tiene secuencias de aminoácidos que tienen al menos 70% o 75% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 80% o 85% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94% o 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido para la molécula de anticuerpo antagonista anti-CD40 de referencia, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 descrito aquí, o a una porción más corta de la molécula anticuerpo de referencia. Más preferiblemente las moléculas comparten al menos una identidad de secuencia del 96%, 97%, 98% o 99%. Para los propósitos de la presente invención, la identidad de secuencia

000095

porcentual se determina utilizando el algoritmo de búsqueda de homología Smith-Waterman que utiliza una búsqueda de espacio fin con una pena abierta de espacio de 12 y una de extensión de espacio de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología Smith-Waterman se enseña en Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Match.* 2: 482-489. Una variante puede, por ejemplo, diferir del anticuerpo anti-CD40 antagonista de referencia por tan poco como 1 a 15 residuos de aminoácidos, tan poco como 1 a 10 residuos de aminoácidos, tal como 6-10, tan poco como 5, tan poco como 4,3, 2, o aun 1 un residuo de aminoácido.

Con respecto al alineamiento óptimo de dos secuencias de aminoácido, el segmento contiguo de la secuencia de aminoácido variante puede tener residuos de aminoácido adicionales o residuos de aminoácidos suprimidos con respecto a la secuencia de aminoácido de referencia. El segmento contiguo utilizado para la comparación con la secuencia de aminoácido de referencia incluirá al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos, y puede ser 30, 40, 50, o más residuos de aminoácido. Se pueden hacer las correcciones para la identidad de secuencia asociada con las sustituciones o espacios de residuos conservadores (ver algoritmo de búsqueda de homología Smith-Waterman).

La estructura química precisa de un polipéptido capaz de unirse específicamente a CD40 y retener la actividad antagonista, particularmente cuando se une a antígeno CD40 sobre las células B malignas depende de numerosos factores. Como los grupos amino y

000096

carboxilo hidrolizables están presentes en la molécula, un polipéptido particular se puede obtener como una sal ácida o básica o en forma neutra. Todas las tales preparaciones que retienen su actividad biológica cuando se ubican en unas condiciones ambientales adecuadas y están incluidas en la definición de los anticuerpos antagonistas anti-CD40 como se utiliza aquí. Además, la secuencia de aminoácido primaria de polipéptidos se puede aumentar al derivar utilizando porciones de azúcar (glicolización) o mediante otra moléculas complementarias tales como lípidos, fosfatos, grupos acetilo y similares. También se puede aumentar mediante la conjugación con sacáridos. Ciertos aspectos de tal aumento son logrados a través de sistema de procesamiento post-transduccionales del huésped de producción; otras de tales modificaciones se pueden introducir in Vitro. En cualquier evento, tales modificaciones están incluidas en la definición de un anticuerpo anti-CD40 utilizado aquí en tanto que las propiedades antagonistas del anticuerpo anti-CD40 no sean destruidas. Se espera que tales modificaciones puedan afectar cuantitativa o cualitativamente la actividad, o al mejorar o disminuir la actividad del polipéptido en los varios ensayos. Además, los residuos de aminoácido individuales en la cadena se pueden modificar mediante oxidación, reducción, u otra derivación y el polipéptido se puede clivar para obtener fragmentos que retengan la actividad. Tales alteraciones que no destruyen la actividad antagonista no remueven la secuencia de polipéptido de la definición de anticuerpo anti-CD40 de interés como se utiliza aquí.

La técnica suministra una guía sustancial con relación a la preparación y uso de las variantes de polipéptido. Al preparar las variantes de anticuerpo anti-CD40, un experto en la técnica puede determinar fácilmente que modificaciones resultaran en el nucleótido de proteína nativo o la secuencia de aminoácido en una variante que sea adecuada para uso como un componente terapéuticamente activo de una composición farmacéutica utilizada en los métodos de la presente invención.

Métodos de Terapia que Utiliza los Anticuerpos Antagonistas
Anti-CD40 de la Invención

Los métodos de la invención están dirigidos al uso de los anticuerpos antagonistas anti-CD40 para tratar pacientes que tiene una enfermedad mediada mediante la estimulación de señalización CD40 sobre células que expresan CD40. Por "célula que expresa CD40" se entiende antígeno CD40 que expresan células B normales y malignas. Los métodos para detectar la expresión CD40 en células son bien conocidas en la técnica e incluyen, pero no están limitadas a, técnicas PCR, inmunohistoquímica, citometría de flujo, Western blot, ELISA, y similares, por célula B "maligna" se entiende cualquier célula B neoplásica, que incluye pero no está limitada a células B derivadas de linfomas que incluyen linfomas de célula B de grado bajo, intermedio y alto, linfomas inmunoblásticos, linfomas no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, linfomas inducidos por el Virus de Epstein-Barr

000390

(EBV), y linfomas relacionados con SIDA, así como también leucemias linfoblásticas agudas de célula B, mielomas, leucemias linfocíticas crónicas, leucemia mieloblásticas agudas y similares.

"Tratamiento" se define aquí como la aplicación o administración de un anticuerpo antagonista anti-CD40 o fragmento que de una a antígeno de este a un paciente, o aplicación o administración de una anticuerpo antagonistas anti-CD40 o fragmento de este a un tejido aislado o línea celular de un paciente, donde el paciente tiene una enfermedad, un síntoma de una enfermedad, o una predisposición hacia una enfermedad, donde el propósito es curar, sanar, aliviar, mejorar, alterar, remediar, mejoramiento, mejora, o afectar la enfermedad, los síntomas de la enfermedad, o la predisposición hacia la enfermedad. Por "tratamiento" se entiende la aplicación o administración de una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos antagonistas anti-CD40 o los fragmentos de estos a un paciente, o la aplicación o administración de una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos anti-CD40 los fragmentos de estos a un tejido aislado o línea celular de un paciente, que tiene una enfermedad, un síntoma de una enfermedad, o una predisposición hacia una enfermedad, donde el propósito es curar, sanar, aliviar, mejorar, alterar, remediar, el mejoramiento, la mejora, o afectar la enfermedad, los síntomas de la enfermedad, o la predisposición hacia la enfermedad.

000099

Por "actividad antitumoral" se entiende una reducción en la proporción de la proliferación o acumulación de célula maligna que expresa CD40, y de esta manera un declive en la proporción de crecimiento de un tumor existente o en un tumor que surge durante la terapia, y/o la destrucción de las células neoplásicas existentes (tumor) o células neoplásicas recientemente formadas, y de esta manera una disminución del tamaño total de una terapia durante el tumor. La terapia con la menos un anticuerpo anti-CD40 (o fragmento que se une a antígeno de este) origina una respuesta fisiológica que es benéfica con respecto al tratamiento de los estados de enfermedad asociados con el estímulo de la señalización CD40 sobre células que expresan CD40 en un humano.

Los métodos de la invención encuentran uso en el tratamiento de linfomas no Hodgkin relacionados con proliferación o acumulación de células B anormales, no controlables. Para los propósitos de la presente invención, tales linfomas se denominara de acuerdo con el esquema de clasificación de *Formulación De Trabajo*, que son aquellos linfomas de célula B categorizados como de grado bajo, grado intermedio y grado alto (ver "The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project" Cáncer 49 (1982): 2112-2135). Así, los linfomas de célula B de bajo grado incluyen linfocítico pequeño, célula folicular clivada pequeña, mezclada folicular y linfomas de célula larga; los linfomas de grado intermedio incluyen célula larga folicular, célula clivada pequeña difusa, pequeña mezclada difusa y célula larga, linfomas de célula larga difusa; y linfomas de alto grado que incluyen

000100

inmunoblásticas de célula larga, linfoblásticas, y linfomas de célula no clivada pequeña del tipo Burkitt y no Burkitt.

Se reconoce que los métodos de la invención son útiles en el tratamiento terapéutico de linfomas de célula B que son clasificados de acuerdo al sistema de Clasificación de Linfomas Europeo y Americano Revisado (REAL). Tales linfomas de célula B incluyen, pero no están limitados a, linfomas clasificados como neoplasmas de célula B precursores, tales como leucemia linfoblástica B/linfoma; neoplasmas de célula B periférico que incluyen leucemia linfocítica crónica de célula B/linfoma linfocítico pequeño, linfoma linfoplasmacitoide/inmunocitoma, linfoma de célula de manto (MCL) linfoma de centro de folículo (folicular) / que incluye célula pequeña difusa, célula pequeña y grande mezclada difusa, y linfomas de célula grande difusa), linfoma de célula B de zona marginal (que incluye tipos extranodal, nodal, y esplénico), leucemia por tricoleucitos, plasmacitoma/mieloma, linfoma de célula B de célula grande de subtipo primario mediastinal (tímico), linfoma de Burkitt, y linfomas de célula B de alto grado similar a Burkitt; leucemia aguda, leucemias linfocíticas agudas, leucemias mieloblásticas; leucemias mielocítica aguda, leucemia promielocítica; leucemia mielomonocítica; leucemia monocítica; eritroleucemia; leucemia granulocítica (leucemia mielocítica crónica), leucemia linfocítica crónica; policitemia vera; mieloma múltiple; macro globulinemia de Waldenstrom; enfermedad de cadena pesada; y linfomas de célula B de bajo grado o alto grado no clasificable.

000101

Se reconoce que los métodos de la invención pueden ser útiles para prevenir sobre crecimiento de tumor adicional que surge durante la terapia. Los métodos de la invención son particularmente útiles en el tratamiento de sujetos que tiene linfomas de célula B de bajo grado, particularmente aquellos sujetos que tienen recaídas luego de la quimioterapia estándar. Los linfomas de célula B de bajo grado son más indolentes que los linfomas de célula B intermedios y de alto grado y se caracterizan con curso de recaída/remisión. Así, el tratamiento de estos linfomas se mejora utilizando los métodos de esta invención en razón de que los episodios de recaída son reducidos en número y en severidad.

Los anticuerpos antagonistas anti-CD40 descritos aquí también pueden encontrar uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y deficiencias o desórdenes en el sistema inmune que incluye, pero no está limitado a, lupus sistémico eritematoso, soriasis, escleroderma, síndrome de CREST, miositis inflamatoria, síndrome de Sjogren, enfermedad de tejido conectivo mezclado, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad del intestino inflamatorio, síndrome de dolor respiratorio agudo, inflamación pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, osteoporosis, hipersensibilidad retardada, asma, cirrosis biliar primaria , y púrpura trombocitopénica idiopática.

De acuerdo con los métodos de la presente invención, al menos un anticuerpo antagonista anti-CD40 (o fragmento de unión de antígeno de este) como se define en cualquier parte aquí se utiliza para promover una respuesta terapéutica positiva con respecto a una célula B humana maligna, por "respuesta terapéutica positiva" con respecto a tratamiento de cáncer se entiende una mejora en la enfermedad en asocio con la actividad antitumoral de estos anticuerpos o fragmentos de estos, y/o mejoras en los síntomas asociados con la enfermedad. Estos es, un efecto antiproliferativo, la prevención de sobre crecimientos de tumor adicionales, una reducción en el tamaño del tumor, una reducción en el número de células de cáncer y/o una disminución en uno o más síntomas mediados por la estimulación de células que expresan CD40 se pueden observar. Así, por ejemplo, una mejora en la enfermedad se puede caracterizar como una respuesta completa. Por "respuesta completa" se entiende una ausencia de enfermedad clínicamente detectable con normalización de cualquier estudio radiográfico previamente anormal, médula ósea, fluido cerebroespinal (CSF). Tal respuesta debe persistir durante al menos un mes luego del tratamiento de acuerdo con los métodos de la invención. Alternativamente, una mejora a la enfermedad se puede caracterizar por ser una respuesta parcial. Por "respuesta parcial" se entiende al menos aproximadamente una disminución del 50% en todos los grupos de tumores medibles (es decir el número de células tumorales presentes en el sujeto) en ausencia de nuevas lesiones y persistiendo durante al menos un mes. Tal respuesta es aplicable a tumores medibles solamente.

000103

La respuesta tumoral se puede evaluar para cambios en la morfología del tumor (es decir grupo de tumor total, tamaño de tumor, y similares) utilizando técnicas de selección tales como exploración de imagen de resonancia magnética (MRI), imágenes radiográficas X, exploración tomográfica computarizada (CT) imagen bioluminiscente, por ejemplo, imagen de luciferaza, imagen de exploración de hueso, y muestreo de biopsia tumoral que incluye aspiración de médula ósea (BMA). Además de estas respuestas terapéuticas positivas, el sujeto que sufre terapia con un anticuerpo antagonista anti-CD40 o un fragmento de unión de antígeno de este puede experimentar el efecto benéfico de una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad. Así para los tumores de célula B, el sujeto puede experimentar una disminución en los así llamados síntomas B, es decir, sudores nocturnos, fiebre, pérdida de peso y/o urticaria.

Por "dosis o cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad efectiva" se entiende una cantidad de anticuerpo antagonista anti-CD40 o fragmento que se une a anticuerpo de este que, cuando se administra efectúa una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento de un paciente con una enfermedad que comprende estimular las células que expresan CD40. en algunas modalidades de la invención, una dosis terapéuticamente efectiva de anticuerpo anti-CD40 o fragmento de este está en el rango de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 40 mg/kg, desde aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, desde

aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 1 a aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, desde aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 o desde aproximadamente 7 mg/kg a aproximadamente 12. Se reconoce que el método de tratamiento puede comprender una administración simple de una dosis terapéuticamente efectiva o administración múltiple de una dosis terapéuticamente efectiva del anticuerpo antagonista anti-CD40 o fragmento que se une a antígeno de este.

Una modalidad adicional de la invención es el uso de anticuerpos antagonistas anti-CD40 para monitorear el diagnóstico de los niveles de proteína en el tejido como parte de procedimiento de ensayo clínico, es decir por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección se puede facilitar mediante el acoplamiento de un anticuerpo a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, y materiales radioactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de cola de caballo, álcali fosfatasa, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluorescina, fluorescein isotiocianato,

000105

rodamina, diclorotriazinilamina fluorescina, cloruro de dansil o ficoeritrina; un ejemplo de material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aecuarina; y ejemplos de materiales radioactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , o ^3H .

Los anticuerpos anti-CD40 descritos aquí pueden adicionalmente ser utilizados para suministrar reactivos, por ejemplo anticuerpos marcados que pueden ser utilizados, por ejemplo para identificar células que expresan CD40. Esto puede ser muy útil para determinar el tipo de célula de una muestra desconocida. Los paneles de anticuerpos monoclonales se pueden utilizar identificar tejido por especies y/o por tipo de órgano. De una forma similar, estos anticuerpos anti-CD40 se pueden utilizar para seleccionar células de cultivo de tejido por contaminación (es decir selección por la presencia de una mezcla de células que expresan CD40 y células que no expresan CD40 en un cultivo).

Los anticuerpos antagonistas anti-CD40 se pueden utilizar en combinación con quimioterapéuticas conocidas y citosinas para el tratamiento de estados de desorden que comprenden células que expresan CD40 estimuladas. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD40 de la invención se pueden utilizar en combinación con citosinas tales como interleucina-2. En otra modalidad, los anticuerpos anti-CD40 de la invención se pueden utilizar en combinación con

000'06

rituximab (IDEC-C2B8; Rituxan®; IDEC Pharmaceuticals Corp., San Diego, California).

De esta manera, los anticuerpos antagonistas anti-CD40 descritos aquí o los fragmentos de unión de antígenos de estos, son administrados en combinación con al menos una otra terapia de cáncer, que incluye, pero no está limitada a, cirugía o procedimientos quirúrgicos (por ejemplo esplenectomía, hepatectomía, linfadenectomía, leucoforesis, trasplante de médula ósea, y similares); terapia de radiación, quimioterapia opcionalmente en combinación con trasplante de médula ósea autóloga, donde los agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no están limitados a, fludarabina o fosfato de fludarabina, clorambucil, pentostatina, 2-clorodeoxiadenosina (cladribina), ciclofosfamida, doxorubicina, prednisona, y combinaciones de estos, por ejemplo, regímenes que contienen antraciclina tales como CAP (ciclofosfamida, doxorubicina más prednisona), CHOP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona más doxorubicina), VAD (vincristina, doxorubicina, más dexametasona), MP (melfalan más prednisona), y otros agentes citotóxicos y/o terapéuticos utilizados en quimioterapia tales como mitoxantrona, daunorubicina, idarubicina, asparaginasa, y antimetabolitos, que incluyen, pero no están limitados a, citarabina, metotrexato, 5-fluorouracil decarbazina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina y nelarabina; otras terapias de anticuerpo monoclonal anticancerígeno (por ejemplo, alemtuzumab (Campath®) u otros anticuerpos anti-CD52 que tienen como objetivo la glicoproteína

000107

de superficie celular CD52 sobre células B malignas; rituximab (Rituxan®), el anticuerpo completo humano HuMax-CD20, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131, tositumomab (Bexxar®), ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), o cualquier otro anticuerpo anti-CD20 terapéutico que tenga como objetivo el antígeno CD20 sobre células B malignas; anticuerpo anti-CD19 (por ejemplo, MT103, un anticuerpo biespecífico); anticuerpo anti-CD22 (por ejemplo, anticuerpo monoclonal humanizado es epratuzumab), bevacizumab (Avasti®) u otro factor anticuerpo anticancerígeno que tenga como objetivo el factor de crecimiento endotelial vascular humano; anticuerpo anti-CD22 que tenga como objetivo el antígeno CD22 sobre células B malignas (por ejemplo el anticuerpo monoclonal BL-22, una toxina alfa CD22); o un anticuerpo α -M-CSF que tenga como objetivo factor de estimulación de colonia de macrófago, anticuerpos que tengan como objetivo el activador receptor del factor-kapa B (RANK) y su ligando (RANKL), que están sobre expresados en mieloma múltiple; y anticuerpo anti-CD23 que tenga como objetivo el antígeno CD23 sobre las células B malignas (IDEC.: 152); Anticuerpo anti-CD80 que tenga como objetivo el antígeno CD88 sobre las células B malignas (IDEC.: 114); Anticuerpo anti-CD38 que tenga como objetivo el antígeno CD38 sobre las células B malignas; anticuerpos que tengan como objetivo los receptores clase II del complejo de histocompatibilidad (anticuerpos anti-MHC) expresados sobre células B malignas; otros anticuerpos anti-CD40 (por ejemplo, SGN-20) que tengan como blanco el antígeno CD40 o las células B malignas; y anticuerpos que tengan como objetivo el receptor 1

del ligando que induce apoptosis relacionado con factor de necrosis tumoral (TRAIL-R1) (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal humano agonístico HGS-ETR1) y el TRAIL-R2 expresado sobre un número de tumores sólidos y tumores de origen hematopoiéticos); Terapia de cáncer basada en molécula pequeña, que incluye, pero no está limitada a, microtúbulo y/o inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo, en inhibidor mitótico de dolastatina y los análogos de dolastatina; el agente de unión de tubulina T900607; XL119; y el inhibidor de topoisomerasa aminocamptotecina), SDX-105 (hidrocloruro de bendamustina) ixabetilona (un análogo de epotilona, también denominado como BMS-247550), inhibidores de quinasa C de proteína, por ejemplo, midostaurina ((PKC-412, CGP 41251, N-benzoilstaurosporina), pixantrona, eloxatina (el agente antineoplásico), ganite (nitrato de galio), Thalomida® (talidomida), derivados inmunomodulatorios de talidomida (por ejemplo, revlimid (anteriormente revimid)), Affinitak™ (inhibidor contrasentido de proteína quinasa C-alfa), SDX-101 (R-etodolac, que induce a apoptosis de linfocitos malignos), análogos de nucleósido de purina de segunda generación tales como clofarabina, inhibidores de producción de proteína Bcl-2 por células de cáncer (por ejemplo los agentes contrasentido oblimersen y Genasense®), inhibidores de proteasoma (por ejemplo, Velcade™ (bortezomib)), inhibidores de quinasa de molécula pequeña (por ejemplo, CHIR-258), inhibidores de VEGF de molécula pequeña (por ejemplo, ZD-6474), inhibidores de molécula pequeña de proteína de choque de calor (HSP) 90 (por ejemplo, 17-AAG), inhibidores de molécula

000100

pequeña de agentes de histona acetilasas (por ejemplo citodiferenciación híbrido/polar HPC) tal como ácido suberanilohidroxámico (SAHA), y FR-901228) y agentes apoptóticos tales como Trisenox® (trióxido de arsénico) y Xcytrin® (motexafin gadolinio); terapias de cáncer basadas en vacunas/inmunoterapia, que incluyen, pero no están limitadas a, aproximaciones de vacuna (por ejemplo, Id-KJH, oncófago, vitaletina), inmunoterapia personalizada o inmunoterapia de idiotipo activo (por ejemplo MyVax®, Personalized Immunotherapy, anteriormente designada GTOP-99), Promune® (CpG 7909, un agonista sintético para un receptor 9 similar a "toll" (TLR9)), terapia de interferon-alfa, terapia de interleucina- 2 (IL-2), terapia de IL-12, terapia de IL-15, y terapia de IL-21; terapia de esteroide; u otra terapia de cáncer; donde la terapia de cáncer adicional se administra antes de, durante, o subsecuente a la terapia de anticuerpo antagonista anti-CD40. Donde las terapias combinadas comprenden la administración de un anticuerpo antagonista anti-CD40 con fragmento de unión de antígeno de este en combinación con la administración de otro agente terapéutico, como con quimioterapia, terapia de radiación, otra terapia de anticuerpo anti-cáncer, terapia de cáncer basado en molécula pequeña, o terapia de cáncer basada en vacunas /inmunoterapia, los métodos de la invención comprenden la co administración, utilizando formulaciones separadas o formulación farmacéutica simple, o una administración consecutiva en cualquier orden. Donde los métodos de la presente invención comprenden regímenes terapéuticos combinados, estas terapias pueden ser dadas simultáneamente, es

000110

decir, el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de este se administra concurrentemente o dentro de la misma estructura de tiempo que la otra terapia de cáncer (es decir, las terapias continúan concurrentemente pero el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de este no se administra precisamente al mismo tiempo que la otra terapia de cáncer). Alternativamente, el anticuerpo anti-CD40 antagonista de la presente invención o el fragmento de unión de antígeno de este se puede administrar antes con subsecuente a la otra terapia de cáncer. La administración secuencial de diferentes terapias de cáncer se puede desarrollar sin importar si el sujeto tratado responde al primer curso de terapia para disminuir la posibilidad de remisión o relapso. Donde las terapias combinadas comprenden la administración del anticuerpo a antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de esta en combinación con administración de un agente citotóxico preferiblemente el anticuerpo antagonista anti-CD40 o fragmento de unión de este se administra antes de la administración del agente citotóxico.

En algunas modalidades de la invención, los anticuerpos anti-CD40 antagonistas descritos aquí, o los fragmentos de unión de antígeno de estos, son administrados en combinación con quimioterapia, y opcionalmente con combinación con transplante de médula ósea autóloga, en donde el anticuerpo y los agentes quimioterapéuticos se pueden administrar secuencialmente, o en cualquier orden, o simultáneamente (es decir, concurrentemente

dentro de la misma estructura de tiempo). Ejemplos de agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero no están limitados a, fludaravina o fludaravina fosfato, clorambuzil, vintristina, ventostatina, 2-clorodenocina, (cladribina) ciclofosfamida, doxorubicina, prednisona, combinaciones de estas, por ejemplo, regímenes que contienen antraciclina tal compuesto CAP (ciclofosfamida, doxorubicina mas prednisona), CHOP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona mas doxorubisina), VAD (vincristina, doxorubicina, mas dexametasona), MP (melfalan mas prednisona), y otros agentes citotóxicos y/o terapéuticos utilizados en quimioterapia tales como mitoxantrona, daunorubicina, idarubicina, asparaginasa, y antimetabolitos, que incluyen, pero no están limitados a, citarabina, metotrexato, 5-fluoracil de carbazina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, y nelarabina. En algunas modalidades, el anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9, o el fragmento de unión de antígeno de este se administra antes del tratamiento con el agente quimioterapéutico. En modalidades alternativas, el anticuerpo antagonista anti-CD40 se administra después de tratamiento con el agente quimioterapéutico. En algunas otras modalidades, el agente quimioterapéutico se administra simultáneamente con el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de este,

Así como por ejemplo, en algunas modalidades el anticuerpo antagonista anti-CD40 por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR

000*12

-12.12 o CHIR -5.9, O el fragmento de unión de antígeno de este se administra en combinación con fluradavina o fluradavina fosfato, en modalidades alternativas, el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de este se administra después del tratamiento con fluradavina o fluradavina fosfato, en algunas otras modalidades la fluradavina o fluradavina fosfato se administra simultáneamente con el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento anti-de antígeno de este.

En otras modalidades de la invención, el clorambusil, una droga alquilante se administra en combinación con el anticuerpo antagonista anti-CD40 descrito aquí, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9, O el fragmento de unión de antígeno de este. En tal modalidad el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de - de antígeno se administra antes de la administración de clorambusil. En modalidades alternativas, el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de este se administra después del tratamiento con clorambusil. En otras modalidades, el clorambusil se administra simultáneamente con el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de este.

En aún otras modalidades, los regímenes que contienen antraciclina tales como CAP (ciclofosfanida, doxorubicina mas prebnisol) y CHOP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona mas doxorubicina), se pueden combinar con administración de un anticuerpo antagonista anti-CD40 descrito aquí, por ejemplo, el

anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9, O el fragmento de unión de antígeno de este. En una de tales modalidades el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de este se administra antes de la administración de regímenes que contienen antraciclina, en otras modalidades el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de este se administra después del tratamiento con regímenes que contienen antraciclina. En aún otras modalidades, el régimen que contiene antraciclina se administra simultáneamente con el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de este.

En modalidades alternativas, el anticuerpo antagonista anti-CD40 descrito aquí, por ejemplo el anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9, O el fragmento de unión de antígeno de este se administra en combinación con alemtuzumab ((Campath®), distribuido por Berlex Laboratorios, Richmond California). Alemtuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante (Campath-1H) que tiene como objetivo el antígeno CD52 expresado en células B malignas. En una de tales modalidades, el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de este se administra antes de la administración de alemtuzumab. En otras modalidades, el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de este se administra después del tratamiento con alemtuzumab. En aún otras modalidades, el alemtuzumab se administra simultáneamente con el anticuerpo

antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de este.

En modalidades alternativas, el anticuerpo antagonista anti-CD40 descrito aquí, por ejemplo, el antígeno monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9, O el fragmento de unión de antígeno de este se administra en combinación con un anticuerpo anti-CD20 terapéutico que tiene como objetivo el antígeno CD20 sobre las células B malignas, por ejemplo, rituximab (Rituxan®), el anticuerpo completamente humano HuMax-CD20, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131, tositumomab (Bexxar®, ibritumomad tiuxetan (Zevalin®), en una de tales modalidades del el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de este se administra antes de la administración del anticuerpo anti-CD20. En otras modalidades, el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno se este se administra después de tratamiento con anticuerpo anti-CD20. En aún otras modalidades, el anticuerpo-CD20 se administra simultáneamente con el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de este.

En modalidades alternativas, el anticuerpo antagonista anti-CD40 descrito aquí, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9, O el fragmento de unión de antígeno de este, se administra en combinación con terapia de cáncer basado en molécula pequeña, que incluye, pero no está limitado a , microtubulo y/o inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo el

inhibidor mitotico dolastatina y análogo de dolastatina; el agente de unión de tubulina (T900607; XL119; y el inhibidor de topoisomerasa aminocamptopesina), SDX-105 (clorhidrato de bendamustina), ixabepilona (un análogo de epotilona, también denominado como BMS-247550), inhibidores de proteína quinasa C, por ejemplo, midostaurina ((PKC-412, CGP41251, N-Benzoilestauroporina), pixaltrona, eloxatina (y un agente antineoplásico), ganite (nitrato de gali), talomida ® (talidomina) (por ejemplo, revlimid (anteriormente remivid)) affinitak™ (inhibidor contra sentido de proteínas quinasa c-alfa), SDX-101 (R-etodolac, que induce apoptosis de linfocitos malignos), análogos de nucleósido de purina de segunda generación tales como clofarabina, inhibidor de producción de proteína Bcl-2 por células de cáncer (por ejemplo, agentes contra sentido oblimersen y Genasense®), inhibidores de proteosoma (por ejemplo, Velcade™ (bortezomid)) inhibidores de quinasa de molécula pequeña (por ejemplo, CHIR-258), inhibidores VEGF de molécula pequeña (por ejemplo, ZD-6474), inhibidores de molécula pequeña de proteína de choque de calor (HSP)90 (por ejemplo, 17-AAG), inhibidores de agentes histona dicetilinas (por ejemplo, citodiferenciación hibrid/polar HPC) Tales como ácido suberanilohidroxámico (SAHA), Y fórmula-901228) de agentes apoptóticos tales como Trisenox® (trióxido arsénico) y Xcitrin® (motexafin gadolinio. En una de tales modalidades, el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de este se administra antes de la administración de terapia de cáncer basada en molécula pequeña. En otras modalidades, el anticuerpo

000116

antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de este se administra después del tratamiento con terapia de cáncer basada en molécula pequeña. En aún otras modalidades, la terapia de cáncer basada en molécula pequeña suministra simultáneamente el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de este.

En aún otras modalidades, el anticuerpo antagonista anti-CD40 descrito aquí, por ejemplo, al anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9, o el fragmento de unión de antígeno de este, se puede utilizar en combinación con terapia de cáncer basado en vacunas de inmunoterapia que incluye, pero no está limitado a, aproximaciones de vacuna (por ejemplo, oncófago Id-KLH, vitaletina), inmunoterapia personalizada o inmunoterapia de idiotipo activo (por ejemplo, inmuno terapia personalizada MyVax® anteriormente designada GTOP-99), Promune® (CpG 7909, un agonista sintético para receptor similar a "toll" 9 (TLR9)), Terapia de interlucina-2 (IL-2), Terapia IL-12: terapia IL-15, y terapia IL-21; terapia esteroide. En una de tales modalidades, el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de este se administra antes de la administración de la terapia de cáncer basada en vacunas/ inmunoterapia. En otras modalidades, el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de este se administra después de tratamiento con terapia de cáncer basada en vacunas/ inmunoterapia. En aún otras modalidades, la terapia de cáncer basada en vacunas/inmunoterapias se administra simultáneamente

con el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de este,

En una de tales modalidades, el anticuerpo antagonista anti-CD40 descrito aquí, como por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9, O el fragmento de unión de antígeno de este, se puede utilizar en combinación con IL-2, el IL-2, un agente conocido por expandir el número de células efectuatoras de muerte natural (NK) en pacientes tratados, se puede administrar antes de, o con, el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de este. Este número expandido de células efectuatoras NK puede conducir a actividad ADCC mejorada del anticuerpo antagonista anti-CD40 administrado o del fragmento de unión de antígeno de este. En otras modalidades, el IL-21 sirve como el agente inmunoterapéutico para estimular la actividad de célula NK cuando se administra en combinación con el anticuerpo antagonista anti-CD40 descrito aquí, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9, O el fragmento de unión de antígeno de este.

Adicionalmente, la terapia de combinación con dos o más agentes terapéuticos y un anticuerpo antagonista anti-CD40 descrito aquí se puede utilizar para el tratamiento de un tratamiento de estados de enfermedad que comprende células que expresan CD40 estimuladas, por ejemplo, cánceres relacionados con célula B, Y desórdenes auto inmune y/o inflamatorios. Sin ser limitantes, los ejemplos incluyen terapia de combinación triple

000118

donde dos agentes quimioterapéuticos se administran en combinación con anticuerpo antagonista anti-CD40, descritos aquí y donde un agente quimioterapéutico y otro anticuerpo monoclonal anticáncer (por ejemplo, alentuzumab, rituximab, o anticuerpo anti-CD23) se administran en combinación con un anticuerpo antagonista anti-CD40 descrito aquí. Ejemplos de tales combinaciones incluyen, pero no están limitados a, combinaciones de fludaravina, ciclofosfamida, y anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9, o el fragmento de unión de antígeno de este; unas combinaciones de fludaravina, un anticuerpo anti-CD20, por ejemplo, rituximab (Rituxan®; IDEC Pharmaceuticals Corp., San Diego, California), y el anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9, o el fragmento de unión de antígeno de este.

Formulaciones Farmacéuticas y Modos de Administración

Los anticuerpos antagonista anti-CD40 de esta invención se administran a una concentración que es terapéuticamente efectiva para prevenir o tratar enfermedades mediadas por célula que expresan CD40 tales como SLE, PBC, ITP, esclerosis múltiple, soriasis, enfermedad de Crohn, rechazo de injerto, linfoma de célula B. para lograr esta meta, los anticuerpos se pueden formular utilizando una variedad de excipientes aceptables conocidos en la técnica. Típicamente, los anticuerpos se administran mediante inyección, o intravenosamente o

intraperitonealmente. Los métodos para lograr esta administración son conocidos por aquellos expertos en la técnica.

También puede ser posible obtener composiciones que puedan ser tópica u oralmente administradas o que puedan ser capaces de transición a través de las membranas de mucosa.

La administración intravenosa ocurre preferiblemente mediante infusión durante un periodo de aproximadamente 1 a 10 horas, más preferiblemente durante aproximadamente 1 a 8 horas, aún mas preferiblemente durante mas de 2 a aproximadamente 7 horas, aún más preferiblemente durante aproximadamente 4 a aproximadamente 6 horas, dependiendo del anticuerpo antagonista anti-CD40 que es administrado. La infusión inicial con la composición farmacéutica puede ser dada durante un periodo de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 horas con las infusiones subsecuentes suministradas más rápidamente. Las infusiones subsecuentes se pueden administrar durante un periodo de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 horas, que incluyen, por ejemplo aproximadamente 1 a aproximadamente 4 horas, aproximadamente 1 a aproximadamente 3 horas, o aproximadamente 1 a aproximadamente 2 horas.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con su ruta pretendida de administración. Los ejemplos de las posibles rutas de administración incluyen administración parenteral, (por ejemplo intravenosa (IV),

intramuscular (IM), intradérmica, subcutánea (SC), o infusión), oral y pulmonar (por ejemplo inhalación), nasal, transdérmica (tópica), transmucosal, y administración rectal. Las soluciones y suspensiones utilizadas para aplicación parenteral, intradérmica, subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos; agentes antibacteriales tales como benzil alcohol o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilenodiaminotetracético; amortiguadores tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de tonicidad tal como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede incluir en ampollas, jeringas desechables, o frascos de dosis múltiple hechos de vidrio o plástico.

El anticuerpo antagonista anti-CD40 son típicamente suministrados mediante la técnica estándar dentro de un amortiguador farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, solución salina estéril, agua amortiguada estéril, propilenglicol, combinaciones de los anteriores, etc. Los métodos para preparar agentes parenteralmente administrables se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (18 th ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990), incorporada aquí como referencia. Ver también, por ejemplo, WO 98/56418, que describe

000'21

formulaciones farmacéuticas de anticuerpo estabilizadas adecuadas para uso de los métodos de la presente invención.

La cantidad de al menos un anticuerpo antagonista anti-CD40 administrado o del fragmento de unión de antígeno de este al ser administrado se determina fácilmente por un experto en la técnica sin experimentación indebida. Los factores que influyen el modo de administración y la respectiva cantidad de al menos un anticuerpo antagonista anti-CD40 (o fragmento de este) incluye, pero no está limitado a, la severidad de la enfermedad, la historia de la enfermedad, y la edad, altura, peso, salud y condición física del individuo que sufre la terapia. Similarmente, la cantidad de anticuerpo antagonista anti-CD40 administrado o del fragmento este al ser administrado dependerá del modo de administración y de si el sujeto sufre una dosis simple o dosis múltiple de este agente antitumoral. De manera general, una dosis superior de anticuerpo antagonista anti-CD40 administrado o del fragmento este se prefiere con un peso creciente del sujeto que sufre la terapia. La dosis anticuerpo antagonista anti-CD40 administrado o del fragmento de este al ser administrado en el rango desde aproximadamente 0.003 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, preferiblemente en el rango de 0.01 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg. Así, por ejemplo, la dosis puede ser 0.01 mg/kg, 0.03 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1mg/kg, 1.5mg/kg, 2 mg/kg, 2.5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, o 50 mg/kg.

000122

En otra modalidad de la invención, el método comprende la administración de dosis múltiples de anticuerpo antagonista anti-CD40 administrado o del fragmento de este. 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 efectivas de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista anti-CD40 administrado o del fragmento de este. La frecuencia y duración de la administración de dosis múltiples de las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpo antagonista anti-CD40 administrado o fragmento de este puede ser fácilmente determinada por un experto en la técnica sin experimentación indebida. Más aún, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo puede incluir un tratamiento simple, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, se trata de un sujeto con anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de este en el rango de aproximadamente 0.1 a 20 mg/kg de peso del cuerpo, una vez por semana para entre aproximadamente 1 a 10 semanas, preferiblemente entre aproximadamente 2 a 8 semanas, más preferiblemente entre aproximadamente 3 a 7 semanas, y aún más preferiblemente durante aproximadamente 4.5 o 6 semanas. El tratamiento puede ocurrir anualmente para prevenir el relapso y luego de indicación de relapso. También se apreciará que la dosis efectiva del anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de este utilizado para el tratamiento puede incrementar o disminuir durante el

curso de un tratamiento particular. Los cambios en la dosis pueden resultar y volverse evidentes de los resultados de los ensayos de diagnóstico como se describen aquí.

Así, en una modalidad, el régimen de dosificación incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente efectiva y al menos un anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de este durante dos días 1, 7, 14 y 21 del periodo de tratamiento. En otra modalidad, el régimen de dosificación incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente efectiva de al menos un anticuerpo antagonista anti-CD40 o de este en 1, 2, 3, 4, 5, 6, y 7 de una semana en un periodo de tratamiento. Las modalidades adicionales incluyen un régimen de dosis que tiene una primera administración de una dosis terapéuticamente efectiva de al menos un anticuerpo anti-CD40 o el fragmento de este en los días 1, 3, 5 y 7 de una semana en un periodo de tratamiento; un régimen de dosificación que incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente efectiva de al menos un anticuerpo anti-CD40 o el fragmento de este a los días 1 y 3 de una semana en un periodo de tratamiento; y un régimen de dosificación preferido que incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente efectiva de al menos anticuerpo anti-CD40 o el fragmento de este en el día 1 de una semana en un periodo de tratamiento. El periodo de tratamiento puede comprender una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, tres meses, seis meses, o un año. Los periodos de tratamiento pueden ser

000174

subsecuentes o separados uno del otro por un día, una semana, dos semanas, un mes, tres meses, seis meses, o un año.

En algunas modalidades, las dosis terapéuticamente efectivas del anticuerpo antagonista anti-CD40 administrado o del fragmento de unión de antígeno de este varía desde aproximadamente 0.003 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, desde aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, desde aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 0.5 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, desde aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, o desde aproximadamente 7 mg/kg a aproximadamente 12 mg/kg. Así, por ejemplo, la dosis de una cualquiera de los anticuerpos antagonistas anti-CD40 administrados o del fragmento de unión de antígeno de este por ejemplo, anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9, o el fragmento de unión de antígeno de este, puede ser 0.003 mg/kg, 0.01 mg/kg, 0.03mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 1.5 mg/kg, 2 mg/kg, 2.5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, u otras de tales dosis que caben dentro del rango de aproximadamente 0.003 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. La misma dosis terapéuticamente efectiva de un anticuerpo antagonista anti-CD40 o del fragmento

de unión de antígeno de este se puede administrar a través de o durante cada semana de dosificación de anticuerpo. Alternativamente, diferentes dosis terapéuticamente efectivas de un anticuerpo antagonista anti-CD40 o del fragmento de unión de antígeno de este se pueden utilizar durante el curso de un periodo de tratamiento.

En otras modalidades, la dosis inicial terapéuticamente efectiva de un anticuerpo antagonista anti-CD40 o del fragmento de unión de antígeno de este como se define en cualquier parte aquí puede estar en el rango de dosificación inferior (es decir, aproximadamente 0.003mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg) con subsecuentes dosis que caen dentro del rango de dosificación superior (es decir, desde aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg).

En las modalidades alternativas, la dosis inicial terapéuticamente efectiva de un anticuerpo antagonista anti-CD40 o del fragmento de unión de antígeno de este como se define en cualquier parte aquí puede estar en el rango de dosificación superior (es decir, aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg) con dosis subsecuentes que caen dentro del rango de dosificación inferior (es decir, desde aproximadamente 0.003 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg). Así, en una modalidad, la dosis inicial terapéuticamente efectiva del anticuerpo antagonista anti-CD40 o del fragmento de unión de antígeno de este es aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 35 mg/kg,

000126

incluyendo aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, y aproximadamente 35 mg/kg, y la dosis subsecuente terapéuticamente efectiva del anticuerpo antagonista anti-CD40 o del fragmento de unión de antígeno de este son aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, que incluye aproximadamente 5 mg/kg, 8 mg/kg, 10 mg/kg, 12 mg/kg, y aproximadamente 15 mg/kg.

En algunas modalidades de la invención, la terapia de anticuerpo antagonista anti-CD40 se inicia al administrar una "dosis de carga" del anticuerpo o el fragmento de unión de antígeno de este al sujeto necesitado de la terapia de anticuerpo antagonista anti-CD40. Por "dosis de carga" se entiende una dosis inicial de un anticuerpo antagonista anti-CD40 o fragmento de unión de antígeno de este que se administra al sujeto, donde la dosis del anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de este administrada cae dentro de el rango de dosificación superior (es decir, desde aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg). La "dosis de carga" se puede administrar como una administración simple, por ejemplo, una infusión simple donde el anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de este se administra IV, o como administraciones múltiples, por ejemplo, infusiones múltiples donde el anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de este se administra IV, en tanto que la "dosis de carga" completa se administra dentro de un periodo de 24 horas.

000127

Luego de la administración de la "dosis de carga", al sujeto le es luego administrado una o mas dosis terapéuticamente efectivas adicionales del anticuerpo antagonista anti-CD40 o al fragmento de la unión de antígeno de este. Subsecuentemente las dosis terapéuticamente efectivas se pueden administrar como por ejemplo, de acuerdo a una programación de dosificación semanal, o una vez cada dos semanas, una vez tres semanas, o una vez cada cuatro semanas. En tales modalidades, las dosis terapéuticamente efectivas subsecuentes generalmente caen dentro del rango de dosificación inferior (es decir, 0.03 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg).

Alternativamente, en algunas modalidades, luego de la "dosis de carga" las dosis subsecuentes terapéuticamente efectivas el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de -antígeno de este suministran de acuerdo a un "programa de mantenimiento", en donde la dosis terapéuticamente efectiva del anticuerpo o fragmento -antígeno de este se administra una vez al mes, una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, una vez cada diez semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada catorce semanas, una vez cada cuatro meses, una cada vez cada dieciocho semanas, una vez cada cinco meses, una vez cada veintidós semanas, una vez cada seis meses, una vez cada siete meses, una vez cada ocho meses, una vez cada nueve meses, una vez cada diez meses, una vez cada once meses, una vez cada doce meses. En tales modalidades, las dosis terapéuticamente efectivas del anticuerpo antagonista anti-CD40 o fragmento de -antígeno de este caen dentro del rango

de dosificación inferior (es decir, 0.003 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg), particularmente cuando las dosis subsecuentes se administran a intervalos mas frecuentes, por ejemplo, una vez cada dos semanas a una vez cada mes, o dentro de un rango de dosificación superior (es decir, es de aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg), particularmente cuando las dosis subsecuentes se administran al menos a intervalos frecuentes, por ejemplo, cuando las dosis subsecuentes se administran aproximadamente un mes a aproximadamente con doce meses de separación.

Los anticuerpos antagonistas anti-CD40 presentes en las composiciones farmacéuticas descritas aquí para uso de los métodos de la invención pueden ser nativos u obtenidos mediante técnicas recombinantes, y pueden ser provenientes de cualquier fuente, que incluyan fuentes de mamífero tales como, por ejemplo, ratón, rata, conejo, primate, cerdo, y humano. Preferiblemente tales polipéptidos se derivan de una fuente humana, más preferiblemente son recombinantes, y proteínas humanas provenientes de líneas de células de hibridoma.

Las composiciones farmacéuticas útiles en los métodos de la invención pueden comprender variantes biológicamente activas de los anticuerpos antagonistas anti-CD40 de la invención. Tales variantes deben retener la actividad biológica deseada del polipéptido nativo de tal forma que la composición farmacéutica que comprende el polipéptido variante tiene el mismo efecto

000129

terapéutico que la composición farmacéutica que comprende el polipéptido nativo cuando se administra a un sujeto. Esto es, el anticuerpo variante anti-CD40 servirá como el componente terapéuticamente activo en la composición farmacéutica de una manera similar a aquella observada en el anticuerpo antagonista nativo, por ejemplo, CHIR-5.9 O CHIR-12.12 como se expresa por la línea celular de hibridoma 5.9 o 12.12, respectivamente. Los métodos están disponibles en la técnica para detectar si un anticuerpo variante anti-CD40 retiene la actividad biológica deseada, y de esta manera sirve como un componente terapéuticamente activo en la composición farmacéutica. La actividad biológica de las variantes de anticuerpos se pueden medir utilizando ensayos específicamente diseñados para medir la actividad del anticuerpo antagonista nativo, que incluye los ensayos descritos en la presente invención.

Cualquier composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista anti-CD40 que tiene unas propiedades de unión descritas aquí como el componente terapéuticamente activo se puede utilizar en los métodos de la invención. Así las composiciones líquidas, liofilizadas o secadas por roseado que comprenden uno o mas anticuerpos antagonistas anti-CD40 de la invención se pueden preparar como una solución acuosa o no acuosa o suspensión para la administración a un sujeto de acuerdo con los métodos de la invención. Cada una de estas composiciones comprenderá al menos un anticuerpo antagonista anti-CD40 como componente terapéutica o profilácticamente activo. Por

000130

"componente terapéutica o profilácticamente activo" se entiende el anticuerpo anti-CD40 que es específicamente incorporado en la composición para efectuar una respuesta terapéutica o profiláctica deseada con relación al tratamiento, prevención o diagnóstico de una enfermedad o condición dentro de un sujeto cuando la composición farmacéutica se administra a ese sujeto. Preferiblemente las composiciones farmacéuticas comprenden agentes estabilizantes apropiados, agentes de masa, o ambos para minimizar los problemas asociados con la pérdida de estabilidad de proteína y actividad biológica durante la preparación y almacenamiento.

Los formulantes se pueden agregar a las composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-CD40 de la invención. Estos formulantes pueden incluir, pero no están limitados a, aceites, polímeros, vitaminas, carbohidratos, aminoácidos, sales, amortiguadores, albúmina, tensoactivos, o agentes de masa. Preferiblemente los carbohidratos incluyen azúcar o alcoholes de azúcar tales como mono- di- o polisacáridos y glucanos solubles en agua. Los sacáridos o los glucanos pueden incluir fructuosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, sucrosa, dextrano, pululan, dextrina, α y β ciclo dextrina, almidón soluble, hidroxietil almidón, y carboximetil celulosa, o mezclas de estos. "Alcohol de azúcar" se define como un hidrocarburo C_4 a C_8 que tiene un grupo hidroxilo incluye galactitol, inositol, manitol, xilitos, sorbitol, glicerol, y arabitól. Estos azúcares o alcoholes de azúcar se pueden utilizar

individualmente o en combinación. La concentración de azúcar o de alcohol de azúcar está entre 1.0% y 7% p/v; más preferiblemente entre 2.0 % y 6.0 % p/v. preferiblemente los aminoácidos incluyen formas levo rotatorias (l) de carnitina, Arginina, y botaina; sin embargo, se pueden agregar otros aminoácidos. Los polímeros preferidos incluyen polivinilpirrodinila (PVP) con un peso molecular promedio entre 2000 y 3000, o polietilenglicol (PEG) con un peso molecular promedio entre 3000 y 5000. Los tensoactivos que se pueden agregar a la formulación son mostrados en las EP números 270, 799 y 268, 110.

Adicionalmente, los anticuerpos pueden ser químicamente modificados mediante conjugación covalente a un polímero para incrementar su vida media circulante, por ejemplo, los polímeros preferidos, y los métodos para unirlos a los péptidos, son mostrados en la Patente U.S No. 4,766,106; 4,179,337; 4,495,285; y 4,609,546; todos los cuales se encontraron aquí como referencia en su totalidad. Los polímeros preferidos son polioles polietoxietilados y polietilenglicol (PEG). El PEG es soluble al agua a temperatura ambiente de cuarto y tiene la fórmula general: $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$ donde R puede ser hidrógeno, o un grupo protector tal como un grupo alquilo o alcanol. Preferiblemente, el grupo protector tiene entre 1 y 8 carbonos, más preferiblemente este es metilo. El símbolo n es un entero positivo preferiblemente entre 1 y 1000, más preferiblemente entre 2 y 500. El PEG tiene un peso molecular promedio preferido entre 1000 y 40000, más preferiblemente entre 2000 y 20000, más

preferiblemente entre 3000 y 12000. Preferiblemente, el PEG tiene al menos un grupo hidroxilo, más preferiblemente este es un grupo hidroxiterminal. Es este grupo hidroxilo el que se activa preferiblemente para reaccionar con el grupo amino libre o el inhibidor. Sin embargo, se entenderá que el tipo y cantidad de los grupos reactivos puede variar para lograr un anticuerpo PEG covalentemente conjugado de la presente invención.

Los polioles polioxi-etilados solubles en agua son también útiles en la presente invención. Ellos incluyen sorbitol polioxi-etilado, glucosa polioxi-etilada, glicerol polioxi-etilado (POG), y similares. El POG es el preferido. Una razón es porque la estructura del glicerol polioxi-etilado es la misma estructura que ocurre naturalmente en, por ejemplo los animales y humanos en mono-, di-, y triglicéridos. Por lo tanto, esta ramificación no necesariamente se vería como un agente extraño en el cuerpo. El POG tiene un peso molecular preferido en el mismo rango que el PEG. La estructura para el POG se muestra en Knauf et al (1998) *J. Bio. Chem.* 263:15064-15070, y la discusión de los conjugados de POG/IL-2 se encuentra en la patente U.S. No. 4,766,106, las cuales ambas se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Otro sistema de suministro de droga para incrementar la vida media circulatoria es el liposoma. Los métodos para preparar sistemas de suministro de liposomas se discuten 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. se

000133

conocen otros sistemas de administración de droga en la técnica y se describen en, por ejemplo, Poznansky et al. (1980) *Drug Delivery Systems* (R.L. Juliano, ed., Oxford, N.Y) pp 253-315, Poznansky (1984) *Pharm Revs* 36:277.

Los formulantes al ser incorporados en una composición farmacéutica deben suministrar la estabilidad del anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de este. Esto es, el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de este deben retener su estabilidad física y/o química y tienen la actividad biológica deseada, es decir, una o más de las actividades antagonistas definidas aquí anteriormente, que incluyen, pero no están limitadas a, inhibición de secreción de inmunoglobulina mediante células B periféricas humanas normales estimuladas por células T; inhibición de supervivencia y/o proliferación de células B periféricas humanas normales estimuladas mediante células T Jurkan; inhibición de supervivencia y/o proliferación de células B periféricas humanas normales estimuladas por células que expresan CD40L o ligando CD40 soluble (sCD40l); inhibición de señales intracelulares anti-apoptóticas "supervivencia" en cualquier célula estimulada por sCD40l o CD40L de fase sólida; inhibición de producción de señal CD40 en cualquier célula luego del ligamiento con sCD40l o CD40L de fase sólida; una inhibición de proliferación de células B malignas humanas como se anota en cualquier parte aquí.

000134

Los métodos para monitorear la estabilidad de proteína son bien conocidos en el arte. Ver, como por ejemplo, Jones (1993) *Adv. Drug. Delivery Rev.* 10:29-90; Lee, ed (1991) *Péptide and Protein Drug Delivery* (Marcel Dekker, Inc., New York); y los ensayos de estabilidad descritos aquí adelante. De manera general, la estabilidad de la proteína se mide a una temperatura escogida durante un periodo de tiempo específico. En modalidades preferidas, un anticuerpo es una formulación farmacéutica de anticuerpo estable suministra la estabilidad del anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de -antígeno de este cuando se almacena a temperatura ambiente de cuarto (aproximadamente 25° C) durante al menos un mes, al menos tres meses, o al menos seis meses, y/o es estable a aproximadamente 2-8° C durante al menos seis meses, al menos nueve meses, al menos doce meses, al menos dieciocho meses, al menos veinticuatro meses.

Una proteína tal como un anticuerpo, cuando se formula en una composición farmacéutica, se considera que retiene su estabilidad física en un punto de tiempo dado si esta no muestra signos visuales (es decir decoloración o pérdida de claridad) o signos medibles (por ejemplo, que utiliza cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) o dispersamiento de luz UV) de precipitación, a agregación o desnaturalización en esa composición farmacéutica. Con respecto a la estabilidad química, una proteína tal como un anticuerpo, cuando se formula en una composición farmacéutica, se considera que retiene su estabilidad química en un punto dado de tiempo si las mediciones de la

estabilidad químicas son indicativas de la proteína (es decir, el anticuerpo) retiene la actividad biológica de interés en esa composición farmacéutica. Los métodos para monitorear los cambios en la estabilidad química son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no están limitados a, métodos para detectar formas químicamente alteradas de la proteína tal como resulta de "clipping" utilizando, por ejemplo, SED-PAGE, SEC, y/o Tiempo/ionización desorción láser de matriz asistida de vuelo de espectrometría de masa; y degradación asociada con cambios en carga molecular (por ejemplo, asociado con desamidación), utilizando, por ejemplo, cromatografía de intercambio de ión. Ver, por ejemplo, los métodos descritos aquí adelante.

Un anticuerpo anti-CD40 antagonista o fragmento de unión a antígeno de este, cuando se formula en una composición farmacéutica, se considera por retener una actividad biológica deseada en un punto de tiempo dado si la actividad biológica deseada en ese tiempo está dentro de aproximadamente 30%, preferiblemente dentro de aproximadamente 20% de la actividad biológica deseada exhibida en el tiempo de la composición farmacéutica, se prepara según se determina en un ensayo adecuado para la actividad biológica deseada. Los ensayos para medir la actividad biológica deseada de los anticuerpos anti-CD40 antagonistas descritos aquí, y los fragmentos de unión a antígeno de este, se pueden desarrollar como se describe en los Ejemplos aquí. Ver también los ensayos descritos en Schultze et al (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 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 estadounidenses Nos. 5,674, 492 y 5, 847,082; incorporados aquí como referencia.

En algunas modalidades de la invención, el anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR-5.9, o el fragmento de unión de antígeno de este se formula en una formulación farmacéutica líquida. El anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de este se puede preparar utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo aquellos métodos descritos aquí anteriormente. En una modalidad, el anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9 o el fragmento de unión de antígeno de este es recombinantemente producido en una línea celular CHO.

Luego de su preparación y purificación, el anticuerpo antagonista anti-CD40 por el método de un -antígeno de este se puede formular como una formulación farmacéutica líquida en la manera establecida aquí. Cuando el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de este va a ser almacenado antes de su formulación, este se puede congelar, por ejemplo, a $\leq 20^{\circ}$ C, y luego descongelada a temperatura ambiente de cuarto para formulación adicional. La formulación farmacéutica

000137

líquida comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo antagonista anti-CD40 o de un fragmento de unión de antígeno de este. La cantidad del anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de este presente en la formulación toma en consideración la ruta de administración y el volumen de dosis deseado.

De esta manera, la composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo CHIR -12.12 o CHIR -5.9, o el fragmento de unión de antígeno de este a una concentración de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 50.0 mg/ml, aproximadamente 0.5 mg/ml a aproximadamente 40.0 mg/ml, aproximadamente 1.0 mg/ml a aproximadamente 30.0 mg/ml, aproximadamente 5.0 mg/ml a aproximadamente 25.0 mg/ml, aproximadamente 5.0 mg/ml a aproximadamente 20.0 mg/ml, o aproximadamente 15.0 mg/ml a aproximadamente 25.0 mg/ml. En algunas modalidades, la composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo antagonista anti-CD40 o un fragmento de unión de antígeno de este a una concentración de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 5.0 mg/ml, aproximadamente 5.0 mg/ml a aproximadamente 10.0 mg/ml, aproximadamente 10.0 mg/ml a aproximadamente 15.0 mg/ml, aproximadamente 15.0 mg/ml a aproximadamente 20.0 mg/ml, aproximadamente 20.0 mg/ml a aproximadamente 25.0 mg/ml, aproximadamente 25.0 mg/ml a aproximadamente 30.0 mg/ml, aproximadamente 30.0 mg/ml a aproximadamente 35.0 mg/ml, aproximadamente 35.0 mg/ml a

000138

aproximadamente 40.0 mg/ml, aproximadamente 40.0 mg/ml a aproximadamente 45.0 mg/ml, aproximadamente 45.0 mg/ml a aproximadamente 50.0 mg/ml. En otras modalidades, la composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo antagonista anti-CD40 o fragmento de -antígeno de este a una concentración de aproximadamente 15.0 mg/ml a aproximadamente 16.0 mg/ml, aproximadamente 17.0 mg/ml a aproximadamente 18.0 mg/ml a aproximadamente 19.0 mg/ml, aproximadamente 20.0 mg/ml a aproximadamente 21.0 mg/ml, aproximadamente 21.0 mg/ml a aproximadamente 22.0 mg/ml, aproximadamente 22.0 mg/ml a aproximadamente 23.0 mg/ml, aproximadamente 24.0 mg/ml, o aproximadamente 25.0 mg/ml. La composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo CHIR -12.12 o CHIR -5.9, o el fragmento de unión de antígeno de este y un amortiguador que mantiene el pH de la formulación en el rango de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0, incluyendo aproximadamente pH 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, y otros de tales valores dentro del rango de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0. En algunas modalidades, el amortiguador mantiene el pH de la formulación en el rango de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 10.5, aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 10.0, aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 5.5, aproximadamente pH 5.5 a aproximadamente pH 7.0, aproximadamente pH 5.5 a aproximadamente pH 6.5 o aproximadamente pH 6.5 a aproximadamente pH 6.0.

000139

Cualquier amortiguador adecuado que mantiene el pH de la formulación de anticuerpo anti-CD40 en el rango de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0. se puede utilizar en la formulación, en tanto que la estabilidad físico química y la actividad biológica del anticuerpo se retienen como se anota aquí atrás. Los amortiguadores adecuados incluyen, pero no están limitados a, ácidos y sales convencionales de estos, donde el contra ión puede ser, como por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o magnesio. Ejemplos de ácidos convencionales y sales de estos que se pueden utilizar para amortiguar la formulación líquida farmacéutica incluye, pero no están limitados a, 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 maléico o meleato, y ácido málico o amortiguadores malato. La concentración del amortiguador dentro de la formulación puede ser desde aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, incluyendo aproximadamente 1 mM, 2 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, u otros de tales valores dentro del rango de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM. En algunas modalidades, la concentración de amortiguador dentro de la formulación va de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, incluyendo aproximadamente 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, otros de tales valores dentro del rango aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM.

006'40

En algunas modalidades de la invención, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo el anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9, o el fragmento de unión de antígeno de este y amortiguador de succinato o amortiguador de citrato a una concentración que mantiene el pH de la formulación en el rango de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0, Preferiblemente aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 6.5. Por "amortiguador succinato" o "amortiguador citrato" se entiende un amortiguador que comprende una sal de ácido succídico o sal de ácido cítrico, respectivamente. En una modalidad preferida, el contra ión succinato o citrato es el catión de sodio, y así el amortiguador de succinato de sodio o citrato de sodio, respectivamente, sin embargo, cualquier cantidad se espera que sea efectiva. Otros cationes posibles de succinato o citrato incluyen, pero no están limitados a, potasio, amonio, calcio y magnesio. Como se anotó anteriormente, la concentración de amortiguador de succinato o citrato dentro de la formulación puede ser aproximadamente un mM aproximadamente 50 mM, que incluye 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 de tales valores dentro del rango de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM. En algunas modalidades, la concentración de amortiguador dentro de la formulación es de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, que incluye aproximadamente 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM,

000141

11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, o aproximadamente 15 mM. En cualquier otras modalidades, la formulación farmacéutica líquida comprende el anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9, o el fragmento de unión de antígeno de este a una concentración de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 50.0 mg/ml, o aproximadamente 5.0 mg/ml a aproximadamente 25.0 mg/ml, y amortiguador de succinato o citrato, por ejemplo, amortiguador de succinato de sodio o de citrato de sodio, a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, preferiblemente aproximadamente 10 mM.

Cuando es deseable para la formulación farmacéutica líquida ser aproximadamente isotónica, la formulación farmacéutica líquida que comprende la cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo antagonista anti-CD40, como por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9, o el fragmento de unión de antígeno de este, y un amortiguador para mantener un pH de formulación dentro del rango de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0 puede comprender además una cantidad de un agente isotonizante suficiente para hacer la formulación cercana a isotónica. Por "cercana a isotónica" se entiende la formulación acuosa que tiene una osmolaridad de aproximadamente 240 mmol/kg a aproximadamente 360 mmol/kg, preferiblemente a aproximadamente 240 a aproximadamente 340mmol/kg, más preferiblemente aproximadamente 250 a aproximadamente 330 mmol/kg, aún más preferiblemente aproximadamente 260 a aproximadamente 320

mmol/kg, aún más preferiblemente aproximadamente 270 a aproximadamente 310 mmol/kg. Los métodos para determinar la isotonicidad de una solución son conocidos por aquellos expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, Setnikar et al (1959) *J. Am. pHarm. Assoc.* 48:628.

Aquellos expertos en la técnica están familiarizados con una variedad de solutos farmacéuticamente aceptables útiles en suministrar 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 a un valor cercamente igual a aquel de una formulación farmacéutica de la presente invención a un valor cercamente igual a aquel de un fluido de cuerpo. Es deseable utilizar un agente isotonizante filológicamente aceptable. Así, la formulación farmacéutica líquida que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo el anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9, o el fragmento de unión de antígeno de este, y un amortiguador para mantener un pH de la formulación dentro del rango de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0, puede comprender además componentes que se pueden utilizar para suministrar isotonicidad, por ejemplo, cloruro de sodio, aminoácidos tales como alanina, valina, y glicina, azúcares y alcoholes de azúcar (polioles), que incluyen pero no están limitados a, glucosa, dextrosa, fructuosa, sucrosa, maltosa, manitol, trealosa, glicerol, sorbitol, y xilitol; ácido acético, otros ácidos

orgánicos o sus sales, y relativamente cantidades menores de citratos o fosfatos. La persona experta en la técnica conocería de agentes adicionales que son adecuados para suministrar tonicidad óptima de la formulación líquida.

En algunas modalidades preferidas, la formulación farmacéuticamente líquida que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9, o el fragmento de unión de antígeno de este, y un amortiguador para mantener el pH de la formulación dentro del rango de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0, comprende además cloruro de sodio como el agente isotonizante. La concentración de cloruro de sodio en la formulación dependerá de la contribución de otros componentes a la tonicidad. En algunas modalidades, la concentración de cloruro de sodio es de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 50 mM a aproximadamente 250 mM, aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM, aproximadamente 50 mM a aproximadamente 175 mM, aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM, aproximadamente 75 mM a aproximadamente 175 mM, aproximadamente 75 mM a aproximadamente 150 mM, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 175 mM, aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM, aproximadamente 100 mM a aproximadamente 150 mM, aproximadamente 125 mM a aproximadamente 175 mM, aproximadamente 125 mM a aproximadamente 150 mM, aproximadamente 130 mM a aproximadamente 170 mM, aproximadamente 130 v a aproximadamente

000144

160 mM, aproximadamente 135 mM a aproximadamente 155 mM, aproximadamente 140 mM a aproximadamente 155 mM, o aproximadamente 145 mM a aproximadamente 155 mM. En Una de tales modalidades, la concentración de cloruro de sodio es aproximadamente 150 mM. En otra de tales modalidades, la concentración de cloruro de sodio es aproximadamente 150 mM, el amortiguador es succinato de sodio o amortiguador de citrato de sodio a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9, o el fragmento de unión de antígeno de este, y la formulación tiene un pH de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0, aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 6.0, O aproximadamente pH 5.5 a aproximadamente pH 6.5. En otras modalidades, la formulación farmacéutica líquida comprende un anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9, o el fragmento de unión de antígeno de este, a una concentración de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 50.0 mg/ml o aproximadamente 5.0 mg/ml a aproximadamente 25.0 mg/ml, aproximadamente 150 mM de cloruro de sodio, aproximadamente 10 mM de succinato de sodio o citrato de sodio, a un pH de aproximadamente pH 5.5.

La degradación de proteína debido al descongelamiento en frío al corte mecánico durante el procesamiento de una formulación farmacéutica líquida de la presente invención se

000145

puede inhibir mediante la incorporación de tenso activos en la formulación con el fin de disminuir la tensión superficial en la interfase solución de un aire, así, en algunas modalidades, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9, o el fragmento de unión de antígeno de este, y un amortiguador para mantener el pH de la formulación dentro del rango de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0, y comprende además un tenso activo. En otras modalidades, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9, o el fragmento de unión de antígeno de este, y un amortiguador para mantener el pH de la formulación dentro del rango de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0, un agente isotonizante tal como cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM, y además comprende un tenso activo.

Los tensoactivos típicos empleados son surfactantes no iónicos, que incluyen ésteres de polioxietilenosorbitol tales como polisorbato 80 (Tween 80) y polisorbato 20 (Tween 20; los ésteres de polioxipropileno-polioxietileno tales como Pluronic F68; alcoholes de polioxietileno tales como Brij 35; simeticona; polientilenglicol tal como PEG400; lisofosfatidicolina; y polioxietileno-p-t-octifenol tal como tritón X-100. La estabilización táctica de los farmacéuticos por tensoactivos o

000:45

emulsificantes como se describe, como por ejemplo, en Levine et al (1991) *J. Parenteral Sci. Technol.* 45(3): 160-165, se incorpora aquí como referencia. Un tensoactivo preferido empleado en la práctica de la presente invención es el polisorbato 80. Cuando se incluya el tensoactivo este se agrega típicamente en una cantidad de aproximadamente 0.001% a aproximadamente 1.0% (p/v), aproximadamente 0.01% a aproximadamente 0.5%, aproximadamente 0.01 % a aproximadamente 0.4%, aproximadamente 0.001 % a aproximadamente 0.3%, aproximadamente 0.001% a aproximadamente 0.2%, aproximadamente 0.005% a aproximadamente 0.5%, aproximadamente 0.005 % a aproximadamente 0.2%, aproximadamente 0.01 % a aproximadamente 0.5%, aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.2 %, aproximadamente 0.03% a aproximadamente 0.5%, aproximadamente 0.03% a aproximadamente 0.3%, aproximadamente 0.05% a aproximadamente 0.5%, o aproximadamente 0.05% a aproximadamente 0.2%.

Así, como en algunas modalidades, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9, o el fragmento de unión de antígeno de este, el amortiguador es succinato de sodio o amortiguador de citrato de sodio a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, o aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM; la formulación tiene un pH de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0, aproximadamente

006:47

pH 5.0 a aproximadamente pH 6.0, o aproximadamente pH 5.5 a aproximadamente pH 10.5; y la formulación comprende además un tensoactivo, por ejemplo, polisorbato 80, en una cantidad de aproximadamente 0.001% a aproximadamente 1.0 % o aproximadamente 0.001% a aproximadamente 0.5%. Tales formulaciones pueden comprender opcionalmente un agente isotonizante, tal como cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente de 50 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM, o aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM. En otras modalidades, la formulación farmacéutica líquida comprende el anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9, o el fragmento de unión de antígeno de este, a una concentración de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 50.0 mg/ml o aproximadamente 5.0 mg/ml a aproximadamente 25.0 mg/ml, que incluye aproximadamente 20.0 mg/ml; aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM de cloruro de sodio, que incluye aproximadamente 150 mM de cloruro de sodio; succinato de sodio o citrato de sodio a aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM, incluye aproximadamente 10 mM de succinato de sodio o citrato de sodio; cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM, que incluye aproximadamente 150 mM; y opcionalmente un tensoactivo, por ejemplo, polisorbato de 80 en una cantidad desde aproximadamente 0.001% a aproximadamente 1.0%, que incluye aproximadamente 0.001% a aproximadamente 0.5%; donde la formulación farmacéutica líquida tiene un pH de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0, aproximadamente pH 5.0

aproximadamente 6.0, aproximadamente pH 5.0 aproximadamente pH 5.5, aproximadamente pH 5.5 a aproximadamente pH 6.5, aproximadamente pH 5.5 aproximadamente pH 6.0.

La formulación farmacéutica líquida puede ser esencialmente libre de cualquier preservativo u otros portadores, excipientes o estabilizadores anotados aquí antes. Alternativamente, la formulación puede incluir uno o más preservativos, por ejemplo agentes antibacteriales, portadores farmacéuticamente aceptables, excipientes o estabilizadores descritos aquí anteriormente siempre y cuando ellos no afecten adversamente la estabilidad físico química del anticuerpo antagonista anti-CD40, o del fragmento de ión de antígeno de este. Ejemplos de portadores aceptables, incipientes, y estabilizadores incluyen, pero no están .limitados a, agentes amortiguantes adicionales, o solventes, tensoactivos, antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina, agentes quelantes tales como EDTA, complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína), y polímeros biodegradables tales como poliésteres. Una discusión completa de la formulación y selección de portadores farmacéuticamente aceptables, estabilizadores, e isomolitos se pueden encontrar en *Remington's pHarmaceutical Sciencies* (18th ed.; Mack Publisching Company, Eaton, Pennyslvania, 1990), incorporado aquí como referencia.

Después de que la formulación farmacéutica líquida u otra composición farmacéutica descrita aquí se prepara, esta se puede

líoofilizar para prevenir degradación. Los métodos para líoofilizar composiciones líquidas son conocidos por aquellos expertos en la técnica. Justo antes de uso, la composición se puede preconstituir con un diluyente estéril (solución de Ringer, agua destilada, o solución salina estéril por ejemplo) que puede incluir ingredientes adicionales. Luego de la reconstitución, la composición se administra preferiblemente a sujetos que utilizan aquellos métodos que son conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Uso de Anticuerpos Antagonistas Anti-CD40 en la Elaboración de Medicamentos.

La presente invención también suministra el uso de un anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de este en la elaboración de un medicamento para tratar un sujeto por un cáncer caracterizado por un crecimiento de célula B neoplásico, en donde el medicamento es coordinado con tratamiento con al menos otra terapia de cáncer. Los cánceres caracterizados por crecimiento de célula B neoplásicos incluyen, pero no están limitados a, los cánceres relacionados con célula B discutidos aquí anteriormente, por ejemplo, linfoma Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, linfoma de célula B, linfoma de célula B de alto grado, linfoma de célula B grado intermedio, linfoma de célula B de bajo grado, leucemia linfoblástica aguda de célula B, leucemia mieloblástica, enfermedad de Hodgkin, falmacitoma, linfoma folicular, linfoma

clivado pequeño folicular, linfoma de célula larga folicular, linfoma clivado pequeño mezclado folicular, linfoma de célula clivada pequeña difusa, linfoma linfocítica pequeña difusa, leucemia prolinfocítica, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de solo marginal, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa, linfoma de célula B monocitoide, linfoma esplénico, leucemia por tricoleucitos, linfoma de célula larga difusa, linfoma de célula B larga mediastinal, granulomatosis linfomatoide, linfomatosis intravascular, linfoma de célula mezclada difusa, linfoma de célula larga difusa, linfoma inmunoblástico, linfoma de Burkitt, linfoma relacionado con SIDA y linfoma de célula de manto.

Por "coordinado" se entiende el medicamento que comprende el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de -antígeno de este que va a ser utilizado antes de, durante, o después del tratamiento del sujeto con al menos otra terapia de cáncer. Ejemplos de otras terapias de cáncer incluyen, pero no están limitados a, cirugía; terapia de radiación; quimioterapia; opcionalmente en combinación con transplante de médula ósea autóloga; donde los agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero no están limitados a , fluradabina o fludarabina fosfato, clorambusil, vincristina, pentosfatina, 2-clorodesoxiadenosina (cladribina), ciclofosfamida, doxorubicina, prednisona, y combinaciones de estos, por ejemplo, regímenes que contienen antraciclina tales como CAP (ciclofosfamida, doxorubicina mas prednisona), CHOP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona mas doxorubisina), VAD (vincristina, doxorubicina, mas

dexametasona), MP (melfalan mas prednisona), y otros agentes citotóxicos y/o terapéuticos utilizados en quimioterapia tales como mitoxantrona, daunorubicina, idarubicina, asparaginasa, y antimetabolitos, que incluyen, pero no están limitados a, citarabina, metotrexato, 5-fluoracil de carbazina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, y nelarabina; otras terapias de anticuerpo molecular anticancerígeno (por ejemplo, alentuzumab (Campath®) u otros anticuerpos anti-CD52 que tienen como objetivo la glicoproteína de superficie celular CD52 sobre células B malignas: rituximab (Rituxan®), el anticuerpo completamente humano HuMax-CD20, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131, tositumomab (Bexxar®, ibritumomad tiuxetan (Zevalin®), o cualquier otro anticuerpo anti-CD20 terapéutico que tiene como blanco el antígeno CD20 sobre células B malignas; el anticuerpo anti-CD19 (por ejemplo, MT 103, un anticuerpo biespecífico); o anticuerpo anti-CD22 (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal humanizado apratuzumab); bevacizumad (Avastin®) u otros anticuerpos anticáncer que tienen como objetivo el factor de crecimiento endotelial vascular humano; el anticuerpo anti-CD22 que tiene como objetivo el antígeno CD22 sobre células B malignas (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal BL-22, una toxina alfa CD22); el anticuerpo α -M-CSF que tiene como objetivo el factor de estimulación de colonia de macrófago; anticuerpos que tienen como objetivo el activador receptor del factor -capa B nuclear (RANK) y su ligando (RANKL), que está sobre expresado en múltiples mielomas; el anticuerpo anti-CD23 que tiene como

objetivo el antígeno CD23 sobre células B malignas (por ejemplo IDEC-152); El anticuerpo anti-CD38 que tiene como objetivo el antígeno CD38 o células B malignas; los anticuerpos que tienen como objetivo los receptores clase II de complejo de histocompatibilidad mayor (anticuerpos anti-MHC) expresados sobre células B malignas; otros anticuerpos anti-CD40 (por ejemplo, SGN-40) que tienen como objetivo el antígeno CD40 sobre células B malignas; y los anticuerpos que tienen como objetivo receptor 1 de ligando que induce apoptosis relacionada con factores de necrosis tumoral 1 (TRAIL-R1) (por ejemplo, que el anticuerpo monoclonal humano agonista HGS-ETR1) expresado sobre un número de tumores sólidos y tumores de origen hematopoyético); terapia de cáncer basada en molécula pequeña, que incluye, pero no está limitado a, microtúbulo y/o inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo, el inhibidor mitótico dolastatina y análogo de dolastatina; el agente de unión de tubulina (T900607; XL119; y el inhibidor de topoisomerasa aminocamptopesina), SDX-105 (clorhidrato de bendamustina), ixabepilona (un análogo de epotilona, también denominado como BMS-247550), inhibidores de proteína quinasa C, por ejemplo, midostaurina ((PKC-412, CGP41251, N-Benzolestauroporina), pixaltrona, eloxatina (y un agente antineoplásico), ganite (nitrato de galio), Thalomida® (talidomina), derivados inmunomodulatorios de talidomina (por ejemplo, revlimid (anteriormente revimid), AffinitakTM (inhibidor contra sentido de proteínas quinasa C-alfa), SDX-101 (R-etodolac, que induce apoptosis de linfocitos malignos), análogos de nucleósido de purina de segunda generación tales como

clofarabina, inhibidor de producción de proteína Bcl-2 por células de cáncer (por ejemplo, agentes contra sentido oblimersen y Genasense®), inhibidores de proteosoma (por ejemplo, Velcade™ (bortezomid)) inhibidores de quinasa de molécula pequeña (por ejemplo, CHIR-258), inhibidores VEGF de molécula pequeña (por ejemplo, ZD-6474), inhibidores de molécula pequeña de proteína de choque de calor (HSP)90 (por ejemplo, 17-AAG), inhibidores de agentes histona dicetilinas (por ejemplo, citodiferenciación híbrido/polar HPC) Tales como ácido suberanilohidroxámico (SAHA), y fórmula-901228) de agentes apoptóticos tales como Trisenox® (trióxido arsénico) y Xcitrin® (motexafin gadolinio); terapias de calcio basadas en vacunas/inmunoterapia, que incluye pero no están limitas a, aproximaciones de vacuna (por ejemplo, oncófago Id-KLH, vitaletina), inmunoterapia personalizada o inmunoterapia de idiotipo activo (por ejemplo, inmuno terapia personalizada MyVax® anteriormente designada GTOP-99), Promune® (CpG 7909, un agonista sintético para receptor similar a "toll" 9 (TLR9)), Terapia de interlucina-2 (IL-2), Terapia IL-12: terapia IL-15, y terapia IL-21; terapia esteroide; u otra terapia de cáncer; donde el tratamiento o terapia de cáncer adicional o terapia de cáncer adicional ocurre antes de, durante, o subsecuentemente al tratamiento del sujeto con medicamento que comprende el anticuerpo antagonista anti-CD40 o un fragmento de antígeno de este como se anotó anteriormente.

En algunas modalidades, la presente invención suministra el uso de un anticuerpo anti-CD40, como por ejemplo, en anticuerpo

monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9, o un fragmento de unión de antígeno de este en la elaboración de un medicamento para tratar un linfoma de célula B, por ejemplo un linfoma Hodgkin, en un sujeto, en donde el medicamento esta coordinado con tratamiento en al menos otra terapia de cáncer seleccionada del grupo que consiste de quimioterapia, terapia de anticuerpo anticáncer, terapia de cáncer basada en molécula pequeña y terapia de cáncer basada en vacuna/inmunoterapia, en donde el medicamento va a ser utilizado antes, durante, después del tratamiento del sujeto con la otra terapia de cáncer o, en el caso de terapias de combinación múltiple, o antes de, durante, o después del tratamiento del sujeto con otras terapias de cáncer.

Así, por ejemplo, en algunas modalidades, la invención suministra el uso de un anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9 , o un fragmento de unión de antígeno de este, en la elaboración de un medicamento para tratar un linfoma de célula B, por ejemplo, linfoma de Hodgkin, en un sujeto, en donde el medicamento es coordinado en el tratamiento con quimioterapia, donde el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste de citoxan, doxorubisina, vincristina, prednisona, y combinaciones de estas, por ejemplo, CHOP. En otras modalidades, la invención suministra el uso de un anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9 , o un fragmento de unión de antígeno de este, en la elaboración de un medicamento para tratar un linfoma de célula B, Por ejemplo un linfoma no Hodgkin, en un sujeto, en donde el medicamento es coordinado con tratamiento con al menos

otro anticuerpo anticáncer seleccionado del grupo que consiste de alemtuzumab (Campath ®), otro anticuerpo anti-CD52 que tiene como objetivo la glicoproteína desuperficie celular C52 sobre células B malignas; rituximab (Rituxan®), el anticuerpo humano completo HuMax-CD20, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131, tositumomab (Bexxar®), ibritumomad tiuxetan (Zevalin®), o cualquier otro anticuerpo anti-CD20 terapéutico que tiene como blanco el antígeno CD20 sobre células B malignas; el anticuerpo anti-CD19 (por ejemplo, MT 103, un anticuerpo biespecífico); o anticuerpo anti-CD22 (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal humanizado apratuzumab); bevacizumad (Avastin®) u otros anticuerpos anticáncer que tienen como objetivo el factor de crecimiento endotelial vascular humano; y cualquiera combinación de estas; en donde el medicamento ha sido utilizado antes de, durante, o después del tratamiento del sujeto con al menos otra terapia de cáncer. O, en el caso de terapias de combinación múltiples antes de, durante, o después del tratamiento del sujeto con las otras terapias de cáncer.

En otras modalidades, la presente invención suministra el uso del anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9, o fragmentos de unión de antígeno de este en la elaboración de un medicamento para tratar un linfoma de célula B, por ejemplo linfoma de no Hodgkin, en un sujeto, en donde el medicamento es coordinado con tratamiento con al menos otra terapia de cáncer basada en molécula pequeña, seleccionada del grupo que consiste de microtubulo y/o inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo el

inhibidor mitótico dolastatina y análogo de dolastatina; el agente de unión de tubulina (T900607; XL119; y el inhibidor de topoisomerasa aminocamptopesina), SDX-105 (clorhidrato de bendamustina), ixabepilona (un análogo de epotilona, también denominado como BMS-247550), inhibidores de proteína quinasa C, por ejemplo, midostaurina ((PKC-412, CGP41251, N-Benzoilestauroporina), pixaltrona, eloxatina (y un agente antineoplásico), ganite (nitrato de galio), Talomida® (talidomina), un agente apoptótico tal como Xcitrin ® (metaxafin gadolinio); inhibidores de producción de proteína de BCL-2 por células de cáncer (por ejemplo, agentes antisentido oblimersen y Genasense®), nelarabina, y cualquiera combinaciones de estos, en donde el medicamento va a ser utilizado antes de, durante, después del tratamiento del sujeto con la otra terapia de cáncer o como en el caso de terapias de combinación múltiple o antes de, durante, o después del tratamiento del sujeto con otras terapias de cáncer.

Así, por ejemplo, en algunas modalidades, la invención suministra el uso de un anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9 , o un fragmento de unión de antígeno de este, en la elaboración de un medicamento para tratar un linfoma de célula B, por ejemplo, linfoma de Hodgkin, en un sujeto, en donde el medicamento es coordinado en el tratamiento con al menos otra terapia de cáncer basada en vacuna/inmunoterapia seleccionada del grupo que consiste de aproximaciones de vacuna (por ejemplo, Id-KLH, oncófago, vitaletina) inmunoterapia personalizada o

000157

inmunoterapia idiотipo activo (por ejemplo, inmuno terapia personalizada MyVax® anteriormente designada GTOP-99), Promune® (CpG 7909, un agonista sintético para receptor similar a "toll" 9 (TLR9)), Terapia de interlucina-2 (IL-2), Terapia IL-12: terapia IL-15, y terapia IL-21; y cualquiera combinación de estas; en donde el medicamento va a ser utilizado antes de, durante, o después del tratamiento del sujeto con la otra terapia de cáncer o, en el caso de combinación múltiples antes de, durante, o después del tratamiento del sujeto con las otras terapias de cáncer.

En otras modalidades, la presente invención suministra el uso del anticuerpo anti-CD40 , O el anticuerpo monoclonal CHIR - 12.12 o CHIR -5.9, o fragmentos de unión de antígeno de este en la elaboración de un medicamento para tratar una leucemia relacionada con célula B, por ejemplo leucemia linfositica aguda de célula B (B-ALL), En un sujeto en donde el medicamento está coordinado con el tratamiento con al menos otra terapia de cáncer seleccionados del grupo que consiste de quimioterapia, terapia de antimetabolito, en donde el medicamento va a ser utilizado antes de, durante, después del tratamiento del sujeto con la otra terapia de cáncer, o en el caso de terapias de combinación múltiple o antes de, durante, o después del tratamiento del sujeto con otras terapias de cáncer. Ejemplos de tales modalidades incluyen, pero no están limitadas a, aquellas instancias donde el medicamento comprende el anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR

-12.12 o CHIR -5.9, o fragmentos de unión de antígeno de este es coordinado con tratamiento con un agente quimioterapéutico o un antimetabolito seleccionado del grupo que consiste de citoxan, doxorubisina, vincristina, prednisona, citarabina, mitoxantrona, idarubicina, asparaginasa, metotrexato, 6-tioguanina y combinaciones de estas; en donde el medicamento ha sido utilizado antes de , durante o después del tratamiento del sujeto con la otra terapia de cáncer o, en el caso de terapias de combinación múltiple, o antes de, durante, o después del tratamiento del sujeto con otras terapias de cáncer. En uno de tales ejemplos, el medicamento es coordinado con tratamiento con citaradina mas daunorubicina, citarabina mas mitoxantrona y/o citarabina mas idarubicina, en donde el medicamento va a ser utilizado antes, durante, después del tratamiento del sujeto con la otra terapia de cáncer o, en el caso de terapias de combinación múltiple, o antes de, durante, o después del tratamiento del sujeto con otras terapias de cáncer.

En algunas modalidades, la invención suministra el uso de un anticuerpo anti-CD40 , por ejemplo anticuerpo monoclonal CHIR -12.12 o CHIR -5.9 , o un fragmento de unión de antígeno de este, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un sujeto para cáncer caracterizado por el crecimiento de célula B neoplásico, que incluye cánceres relacionados con célula B descritos aquí anteriormente, en donde el medicamento es utilizado en un sujeto que ha sido pretratado con al menos otra terapia de cáncer. Por "pretratado" o "pretratamiento" se

000'59

entiende que el sujeto ha recibido una o más de otras terapias de cáncer (es decir, ha sido tratado con al menos otra terapia de cáncer) antes de recibir el medicamento que comprende el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de este. "pretratado" o "pretratamiento" se entiende que el sujeto, ha sido tratado con al menos otra terapia de cáncer dentro de los dos años, dentro de los dieciocho meses, dentro del año, dentro de los seis meses, dentro de los dos meses, dentro de las seis semanas, dentro de la semana, dentro de las cuatro semanas, dentro de las tres semanas, dentro de las dos semanas, dentro de la semana, dentro de seis días, dentro cinco días, dentro de cuatro días, dentro de tres días, dentro de dos días, o aún dentro de un día antes de la iniciación del tratamiento con el medicamento que comprende el anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal m CHIR -12.12 o CHIR -5.9, descrito aquí, o el fragmento de unión de antígeno de este. No es necesario que el sujeto responda al tratamiento con la terapia de cáncer anterior, o las terapias de cáncer anteriores. Así, el sujeto que recibe el medicamento que comprende el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión de antígeno de este pudiera haber respondido, o pudiera haber fallado a la respuesta (es decir el cáncer fuera refractario), pretratamiento con la terapia de cáncer anterior, o para una o más de las terapias contra cáncer anteriores en donde el pretratamiento comprende múltiples terapias contra el cáncer. Ejemplos de otras terapias contra el cáncer para los cuales un sujeto puede haber recibido pretratamiento antes de recibir el medicamento comprende el

000160

anticuerpo anti-CD40 antagonista o fragmento de unión a antígeno de este que incluye, pero no está limitado a, cirugía; terapia de radiación; quimioterapia, opcionalmente en combinación con trasplante de médula ósea, autóloga, en donde los agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero no están limitados a, aquellos listados aquí anteriormente; otra terapia de anticuerpo monoclonal anticáncer, que incluyen, pero no están limitados a, aquellos anticuerpos anticáncer listados aquí anteriormente, terapia contra el cáncer basada en moléculas pequeñas, que incluyen pero no están limitadas a, las moléculas pequeñas listadas aquí anteriormente; terapias contra el cáncer basadas en vacunas/inmunoterapia, que incluyen, pero no están limitadas a aquellas listadas aquí anteriormente; terapia esteroide; otras terapias contra el cáncer; o cualquier combinación de estos.

"Tratamientos" en el contexto de uso coordinado de un medicamento descrito aquí con uno o más de otras terapias contra el cáncer aquí se define como la aplicación o administración del medicamento o de la otra terapia contra el cáncer a un sujeto, o aplicación o administración del medicamento u otra terapia contra el cáncer a un tejido aislado o línea de células de un sujeto, en donde el sujeto tiene un cáncer caracterizado por el crecimiento de células de neoplásicas, un síntoma asociado con tal cáncer o una predisposición contra el desarrollo de tal cáncer; en donde el propósito es curar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, mejorar o afectar el cáncer, cualquier síntoma asociado al cáncer, o la disposición hacia el desarrollo del cáncer.

000'61

Los siguientes ejemplos se ofrecen por vía de ilustración y no por vía de limitación.

EXPERIMENTAL

Los anticuerpos antagonistas anti-CD40 utilizados en los ejemplos adelante son anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12. Los anticuerpos anti-CD40 CHIR-5.9 y CHIR-12.12 son anticuerpos monoclonales CD-40 antihumano subtipo IgG₁ humano (mAbs) generado por inmunización de ratones transgénicos que llevan el locus de cadena pesada IgG₁ humana y el locus de cadena liviana k humana (XenoMouse® technology; Abgenix; Fremont, California). Como se muestra por el análisis FACS, el CHIR-5.9. y el CHIR-12.12 se unen específicamente al CD40 humano y pueden imitar la unión del ligando CD40. Ambos mAbs pueden competir a la preunión del ligando CD40 a la superficie celular CD40. Ambos anticuerpo son fuertes antagonistas e inhiben la proliferación mediada por ligando CD40 *in vitro* de células B normales, así como también las células de cáncer de los pacientes NHL y CLL. *In vitro*, ambos anticuerpos matan las líneas de células de cáncer así como también las líneas de cáncer primarias de pacientes NHL por ADCC. Se vio actividad antitumor dependiente de la dosis en un modelo de linfoma humano de xenoingerto. La afinidad de unión del CHIR-5.9 al CD40 humano es 1.2×10^{-8} M y la afinidad de unión del CHIR-12.12 al CD40 humano es 5×10^{-10} M.

000102

La línea de hibridoma de ratón 131.2F8.5.9 (CMCC#12047) y la línea de hibridoma 153.8E2.D10.D6.12.12 (CMCC#12056) se han depositado con el American Type Culture Collection [ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209 (USA)] bajo el Número de Depósitos de Patentes PTA-5542 y PTA-5543, respectivamente.

Se han utilizado los siguientes protocolos en los ejemplos descritos adelante.

Ensayo ELISA para Cuantificación de Inmuglobulina

Las concentraciones de IgM e IgG humano se estiman por ELISA. Se cubren placas ELISA de 96 pozos con 2 µg/ml de IgG MAb antihumano de cabra (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) o con 2 µg/ml de IgM MAb 4102 antihumano de cabra (Bio Source Internacional, California) en 0.05 M de amortiguador de carbonato (pH 9.6), mediante incubación de 16 horas a 4° C. Las placas se lavan tres veces con PBS-0.05% Tween-20 (PBS-Tween) y se saturan con BSA durante una hora. Después de dos lavadas las placas se incuban durante dos horas a 37° C con diferentes diluciones de las muestras de ensayo. Después de tres lavadas, el Ig unido se detecta por incubación durante 2 horas a 37° C con 1 µg/ml de IgG MAb antihumano de cabra etiquetado peroxidasa o IgM MAb antihumano de cabra. Las placas se lavan cuatro veces y se une actividad peroxidasa que se revela por la adición de O-fenilendiamina como un sustrato. Los estándares IgG o IgM humano

000163

(Caltag, Burlingame, California) se utilizan para establecer una curva estándar para cada ensayo.

Aislamiento de las Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC) de Sangre Periférica humana

Se agrega 20 ml de solución Ficoll-Paque (baja endotoxina; Pharmacia) por tubo de poliestireno de 50 ml, en tres tubos, treinta minutos antes de agregar la sangre. La solución Ficoll-Paque se calienta a temperatura ambiente. Se preparan 3 L de blanqueador en dilución 1:10, y se utiliza para lavar todos los tubos y pipetas que entran en contacto con la sangre. La sangre fue puesta en la parte superior de la solución Ficoll-Paque sin perturbar la capa Ficoll, en 1.5 ml de sangre/1 ml de Ficoll-Paque. Los tubos se centrifugan a 1700 rpm durante 30 minutos de temperatura ambiente con el freno de la centrifuga apagado. Se remueve tanto como se posible la capa superior (plasma), minimizando el vacío con el fin de evitar remover la segunda capa de solución. La segunda capa, que contiene los linfocitos B y T se recolecta utilizando una pipeta Pasteur estéril, y se coloca en dos tubos de polietileno de 50-ml. La colección se diluye con 3 x de volumen de RPMI frío sin aditivos, y los tubos se centrifugan a 1000 RPMI durante diez minutos. El medio se remueve por aspiración, y las células de ambos tubos de 50-ml se resuspenden en un total de 10 ml de RPMI frío (con aditivos) y se transfieren a un tubo de 15-ml. Las células se cuentan utilizando el hemacitómetro, luego se centrifugan a 1000 RPM durante 10

000*02

minutos. El medio se remueve y las células se resuspenden en 4 ml de RPMI. Esta fracción contiene el PBMC.

Aislamiento de Células B de PBMC

Se colocan 100 µl de Dynabeads (anti-h CD19) en un tubo plástico de 5-ml. Se agregan 3 ml de PBS estéril a los glóbulos y se mezcla, y se coloca en el soporte magnético, luego se le permite sentarse durante dos minutos. La solución se remueve utilizando una pipeta Pasteur. Se agrega 3 ml de PBS estéril, se mezcla y se coloca en el soporte magnético, luego se le permite sentarse durante dos minutos. Este procedimiento con PBS estéril se repite una vez más para un total de tres lavadas. Se agrega PBMC a los glóbulos y se incuban, mientras se mezcla, durante 30 minutos a 40° C. El tubo que contiene el PBMC y los glóbulos se colocan en el soporte magnético durante dos minutos, luego la solución se transfiere a un nuevo tubo de 5-ml en el soporte magnético. Después de 2 minutos, la solución se transfiere a un nuevo tubo de 15-ml. Esta etapa se repite cuatro veces más, y las soluciones de las primeras 4 veces se recolectan en el tubo de 15-ml, luego se centrifugan a 1000 RPM durante 5 minutos. Esta etapa produce la pastilla para la separación de célula T.

Se agrega 100 µl de RPMI (con aditivos) para recolectar los glóbulos, y la solución se transfiere en un tubo de 0.7 ml. Se agrega 10 µl de glóbulos Dynal Detacha dentro de una solución de temperatura ambiente y se permite rotar durante 45 minutos. La

000'05

suspensión se transfiere dentro de un nuevo tubo de 5 ml y 3 ml de RPMI (con aditivos se agrega). El tubo se coloca en el soporte magnético durante dos minutos. La solución se transfiere dentro de un nuevo tubo de 5 ml en el soporte durante dos minutos, luego a un tubo de 15 ml. La etapa anterior se repite tres veces más, recolectando la solución en el tubo de 15 ml. El tubo de 15 ml se centrifuga a 1000 RPM durante 10 minutos, y las células resuspendidas en 10 ml de RPMI. La etapa de lavado se repite dos veces más para un total de tres lavadas. Las células se cuentan antes de la última centrifugación. Esta etapa completa la purificación de célula B. Las células se almacenan en 90% de FCS y 10% de DMSO y se congelan a -800° C.

Aislamiento de Células T

Se prepara Columna de Enriquecimiento de células T humanas (R&D systems, kit de columna CD 3 anti-h) utilizando 20 ml de amortiguador de lavado de columna 1 X al mezclar 2 ml de amortiguador de lavado de columna 10 X y 18 ml de agua destilada estéril. La columna se limpia con 70% de etanol y se coloca en la parte superior de un tubo de 15 ml. La tapa superior de la columna se remueve primero para evitar que entre aire al fondo de la columna. Luego, se remueve la tapa del fondo y se limpia la punta con 70% de etanol. El fluido dentro de la columna se le permite drenar dentro del tubo de 15 ml. Se coloca un nuevo tubo de 15 ml estéril bajo la columna después que el amortiguador de columna ha drenado al nivel del filtro blanco. La fracción de

000'00

PBMC agotado célula B se suspende en un 1 ml de amortiguador y se agrega a la parte superior de la columna. A las células se les permite incubarse con la columna a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se lavan las células T a partir de la columna con cuatro alícuotas de 2 ml de un amortiguador de lavado de columna 1 X. Las células T recolectadas se centrifugan a 1000 RPM durante 5 minutos. Se remueve el supernadante y las células se resuspenden en 10 ml de RPMI. Las células se cuentan y se centrifugan una vez más. Se remueve el supernadante, completando la purificación de célula T. Las células se almacenan en 90% de FCS y 10% de DMSO y se congelan a -80° C.

Para los procedimientos anteriores, la composición RPMI que contiene 10% de FCS (inactivo a 56° C por 45 min), 1% Pen/Strep (100 u/ml Penicilina, 0.1 µg/ml Estreptomicina), 1% Glutamato, 1% puravato de sodio, 50 µM 2-ME.

Ensayo Citofluorométrico de Flujo

Se incuban células Ramos (106 células/muestras) en 100 µl de anticuerpo primario (10 µl/ml en PBS-BSA) durante 20 min a 4° C. Después de 3 lavadas con PBS-BSA o HBSS-BSA, se incuban las células en 100 µl de fragmentos F(ab')₂ etiquetada FITC de anticuerpos anti-(IgG humanos) de cabra (Caltag) durante 20 min a 4° C. Después de tres lavadas con PBS-BSA y una lavada con PBS, las células se resuspenden en 0.5 ml de PBS. Se desarrollan análisis con FACSCAN V (Becton Dickinson, San Jose, California).

000167

Generación de Clones de Hibridoma

Esplenocitos de ratones inmunizados se fusionan con SP 2/0 o P 3 x 63Ag8.653 células de mieloma de murina en una proporción de 10:1 utilizando 50% de polietilenglicol como se describe previamente por de Boer et al. (1988) *J. Immunol. Meth.* 113:143. Las células fusionadas se resuspenden en medio IMDM completo suplementado con hipoxantina (0.1 mM), aminopterina (0.01 mM), timidina (0.016 mM), y 0.5 ng/ml hIL-6 (Genzyme, Cambridge, Massachussets). Las células fusionadas se distribuyen luego entre los pozos de placas de cultivo de tejido de 96 pozos, de tal forma que cada pozo contiene un hibridoma en crecimiento en promedio.

Después de 10-14 días los súper nadantes de las poblaciones de hibridoma se seleccionan para la producción de anticuerpo específico. Para la selección de producción de anticuerpo específico por los clones de hibridoma, los súper nadantes de cada pozo se agrupan y ensayan para especificidad de actividad anti-CD40 por primero ELISA. Los positivos fueron luego utilizados para teñido de célula fluorescente de células B transformadas EBV según se describe para el ensayo de FACS anterior. Las células de hibridoma positivas se clonan dos veces al limitar la dilución en IMDM/FBS que contiene 0.5 ng/ml hIL-6.

Ejemplo 1: Producción de Anticuerpos Anti-CD40

Varios anticuerpos monoclonales anti-CD40 antagonistas, completamente humanos de isotipo IgG1 se generan. Ratones transgénicos que llevan el locus de cadena pesado IgG1 humano y el locus de cadena K humano (Abgenix γ -1XenoMouse® technology (Abgenix; Fremont, California)) se utilizan para generar estos anticuerpos. Las células de insectos SF9 que expresan el dominio extracelular CD40 se utilizan como inmunógeno. Un total de 35 vasos de ratón se fusionan con las células SP2/0 de mieloma de ratón para generar 895 anticuerpos que reconocen el CD40 recombinante en ELISA (Tabla 1A y 1B). Un promedio aproximadamente de 10% de hibridomas producidos utilizando tecnología Abgenix XenoMouse® puede contener cadena liviana lambda en vez de cadena kapa humana. Los anticuerpos que contienen cadena lambda y liviana se seleccionan. Un subconjunto de 260 anticuerpos que también muestran unión a la superficie de células CD40 se seleccionan para análisis adicionales. Los hibridomas estables seleccionados durante una serie de procedimientos de subclonación se utilizan para caracterización adicional en ensayos de unión y función.

Tabla 1A. Una Fusión Típica

000000

# de fusión	Título anti CD40		# de células seleccionadas	# de ELISA*	# de célula de Superficie*
	(1:100K)	Eficiencia de fusión			
153	3	100%	960	123	33
154	4.67	15%	140	0	0
155	6	~40%	960	3	3
156	3.17	~25%	220	1	0
157	4.67	90%	960	32	6
158	4.4	90%	960	23	8
159	1.17	100%	960	108	18
160	1.78	90%	960	30	5
Total			6120	320	73

Tabla 1B. Resumen de Cuatro Conjuntos de Fusiones

# de ratón	Hibridomas positivos -ELISA	Hibridomas positivos de superficie celular
31	895	260

Tabla 2. Resumen de conjunto inicial de datos con anticuerpo anti-CD40 IgG1

Hibridoma Madre	Clones de hibridoma	Unión de su- perficie celular	Antagonista	ADCC	CDC	CMCC#	Secuencia de ADN de región V
	131.2F5.8.5.1	+++	++	ND	ND	ND	
131.2F5	131.2F5.8.5.9	+++	+++	++	-	12047	Si
	131.2F5.8.5.11	+++	+++	++	-	12055	Si
	153.3C5D8D7.8.4.7.1	++	ND	ND	ND	ND	
153.3C5	153.3C5D8D7.8.4.7.8	++	ND	ND	ND	ND	
	153.3C5D8D7.8.4.7.11	+++	+++	+	ND	ND	
	153.1D2.9.1	+++	ND	ND	ND	12067	
153.1D2	153.1D2.9.8	+++	+++	++	-	12057	
	153.1D2.9.12	+++	ND	ND	ND	12068	
	158.6F3.5.1	+++	+++	++	-	12054	
158.6F3	158.6F3.5.7	+++	ND	ND	ND	12061	
	158.6F3.5.10	+++	ND	ND	ND	12062	
	153.8E2D10D6.12.7	+++	ND	ND	ND	12075	
153.8E2	153.8E2D10D6.12.9	+++	ND	ND	ND	12063	
	153.8E2D10D6.12.12	+++	+++	+++	-	12056	Si
	155.2C2E9F12.2.10.4	+++	+/-	ND	ND	12064	
155.2C2	155.2C2E9F12.2.10.5	+++	ND	ND	ND	12065	
	155.2C2E9F12.2.10.6	+/-	ND	ND	ND	12066	
	166.5E6G12.1	+++	ND	ND	ND	12069	
166.5E6	166.5E6G12.3	+++	ND	ND	ND	12070	
	166.5E6G12.4	+++	+	ND	ND	12071	
177.8C10	177.8C10B3H9	+++	++	ND	ND	ND	
	183.4B3E11.6.1.5	++	ND	ND	ND	ND	
183.4B3	183.4B3E11.6.1.9	++	ND	ND	ND	ND	
	183.4B3E11.6.1.10	+++	++	ND	ND	ND	
	183.2G5D2.8.7	+++	+/-	ND	ND	ND	
183.2G5	183.2G5D2.8.8	+++	ND	ND	ND	ND	
	183.2G5D2.8.9	+++	ND	ND	ND	ND	
	184.6C11D3.2	++	ND	ND	ND	12078	
184.6C11	184.6C11D3.3	++	ND	ND	ND	12080	
	184.6C11D3.6	+/-	+/-	ND	ND	12079	
	185.3E4F12.5.6	+++	ND	ND	ND	12072	
185.3E4	185.3E4F12.5.11	+++	ND	ND	ND	12073	
	185.3E4F12.5.12	+++	+	ND	ND	12074	
	185.1A9E9.6.1	+	ND	ND	ND	ND	
185.1A9	185.1A9E9.6.6	+++	+++	+	ND	ND	
	185.9F11E10.3B5.1	+++	ND	ND	ND	ND	
185.9F11	185.9F11E10.3B5.8	+++	ND	ND	ND	ND	
	185.9F11E10.3B5.12	+++	+++	ND	ND	ND	

Clones de 7 hibridomas madre se identifican por tener actividad antagonista. Basado en su potencia antagonista relativa y actividades ADCC, se seleccionan dos clones hibridoma. Sus nombres son: 131.2F8.5.9 (5.9) y 153.8E2.D10.D6.12.12 (12.12).

000171

Se identifican otros 7 hibridomas de clones por tener actividad antagonista (Tabla 2 anterior). Basado en su potencia antagonista relativa y actividades ADCC, dos clones de hibridoma se seleccionan para evaluación adicional. Ellos se llaman 131.2F8.5.9 (5.9) y 153.8E2.D10.D6.12.12 (12.12). El perfil de unión de estos dos anticuerpos para la línea de célula de linfoma CD40+ se muestra como un histograma citométrico en la Figura 1.

Ejemplo 2: Secuencia de Aminoácido y Polinucleótido de Anticuerpos Anti-CD40 Humano

Los cADN que codifican las regiones variables de los anticuerpos candidatos se amplifican por PCR, se clonan y se secuencian. Las secuencias de aminoácido para la cadena liviana y la cadena pesada del anticuerpo CHIR-12.12 se establecen en las Figuras 9A y 9B, respectivamente. Ver también ID de SEC No.: 2 (cadena liviana para mAb CHIR-12.12) y ID de SEC No.: 4 (cadena pesada para mAb CHIR-12.12). Una variante de la cadena pesada para el mAb CHIR-12.12 se muestra en la Figura 9B (ver también ID de SEC No.: 5), que difiere de la ID de SEC No.: 4 en que tiene un residuo serina sustituido para el residuo alanina en la posición 153 de la ID de SEC No.: 4. Las secuencias del nucleótido que codifican la cadena liviana y la cadena pesada del anticuerpo CHIR-12.12 se establecen en las Figuras 10A y 10B, respectivamente. Ver también ID de SEC No.: 1 (Secuencia de codificación para la cadena liviana para el mAb CHIR-12.12) y ID de SEC No.: 3 (secuencia de codificación para la cadena pesada

para el mAb CHIR-12.12). Las secuencias de aminoácido para la cadena liviana y la cadena pesada del anticuerpo CHIR-5.9 se establecen en las Figuras 11A y 11B, respectivamente. Ver también ID de SEC No.: 6 (cadena liviana para mAb CHIR-5.9) y ID de SEC No.: 7 (cadena pesada para mAb CHIR-5.9). Una variante de la cadena pesada para el mAb CHIR-5.9 se muestra en la Figura 11B (ver también ID de SEC No.: 8), que difiere de la ID de SEC No.: 7 en que tiene un residuo serina sustituido por el residuo alanina en la posición 158 de la ID de SEC No.: 7.

Como se espera para los anticuerpos derivados de hibridomas independientes, existe una variación sustancial en las secuencias de nucleótido en las regiones que determinan complementariedad (CDRs). La diversidad en la región CDR3 de V_h se cree determina más significativamente la especificidad del anticuerpo.

Ejemplo 3: Efecto del CHIR-5.9 y CHIR-12.12 en la Interacción CD40/CD40L *In vitro*

Los anticuerpos candidatos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 evitan la unión del ligando CD40 a la superficie celular CD40 y desplazan el ligando CD40 preunido. Los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 se ensayan para su capacidad de evitar la unión del ligando CD40 al CD40 en la superficie de una línea de células de linfoma (Ramos). La unión de ambos anticuerpos (no marcados) evita la posterior unión del ligando PE-CD40 mediante ensayos citométricos de flujo (Figura 2A). En un segundo conjunto de ensayos los dos

anticuerpos se ensayan para su capacidad de reemplazar el ligando CD40 preunido a la superficie celular CD40. Ambos anticuerpos son efectivos para competir el ligando CD40 con el CHIR-5.9 que es ligeramente más efectivo que el CHIR-12.12 (Figura 2B).

Ejemplo 4: CHIR-5.9 y CHIR-12.12 se Unen a Diferentes Epítomos en el CD40 a Diferencia del 15B8

Los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 compiten el uno con el otro para unirse al CD40 pero no con 15B8, un IgG₂ anti-CD40 mAb (ver Publicación Internacional No. WO 02/28904). Los estudios de unión de competición de anticuerpo que utilizan Biacore se diseñan utilizando chips biosensores CM5 con proteína A inmovilizado por vía de acoplamiento de amina, que se utiliza para capturar cualquier anti-CD40 CHIR-12.12, o 15B8. Las curvas de unión de asociación/disociación normales se observan con concentraciones variantes de CD40-his (datos no mostrados). Para estudios de competición, el CHIR-12.12 o el 15B8 se capturan en la proteína de superficie A. Subsecuentemente un complejo CD40-his/CHIR-5.9 Fab (100 nM CD40: 1 µM CHIR-5.9 Fab) en concentraciones variantes, fue fluido a través de la superficie modificada. En el caso del CHIR-12.12, no hubo asociación del complejo observado, lo que indica que el CHIR-5.9 bloquea la unión del CHIR-12.12 para el CD40-his. Para el 15B8, la asociación del complejo Fab CHIR-5.9 se observa indicando que el CHIR-5.9 no bloquea la unión del 15B8 al sitio de unión CD40. Sin embargo, la

desproporción del complejo se incrementa dramáticamente (datos no mostrados).

También se ha determinado que el 15B8 y el CHIR-12.12 no compiten para unión CD40-his. Este experimento se establece al capturar el CHIR-12.12 en el chip biosensor de proteína A, que bloquee los sitios de proteína A residuales con hIgG₁ de control, que une el CD40-his y luego fluyendo el 15B8 sobre la superficie modificada. El 15B8 se une bajo estas condiciones lo que indica que CHIR-12.12 no bloquee el 15B8 de unirse al CD40.

Ejemplo 5: Propiedades de Unión de Hibridomas Seleccionados

La proteína A se inmoviliza sobre los chips biosensores CM5 por vía de acoplamiento de amina. Los anticuerpos monoclonales anti-CD40 humanos, en 1.5 µg/ml, se capturan en la superficie biosensora durante 1.5 minutos a 10 µl/min. El CD40-his soluble recombinante se fluye sobre la superficie biosensora en concentraciones variantes. El anticuerpo y el antígeno se diluyen en 0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% de tensoactivo P20 (HBS-EP). Las constantes cinéticas y de actividad se determinan utilizando el software "Biaevaluation" con un ajuste de interacción de modelos/global 1:1.

Como se muestra en la Tabla 3 adelante, hay una diferencia de 121 veces en la desproporción del CHIR-5.9 y CHIR-12.12 lo que resulta en 24 veces de afinidad mayor para el CHIR-12.12.

Anticuerpo	k_a (M ⁻¹ sec ⁻¹)	k_d (sec ⁻¹)	KD (nM)
Anti-CD40, CHIR-5.9	$(12.35 \pm 0.64) \times 10^5$	$(15.0 \pm 1.3) \times 10^{-3}$	12.15 ± 0.35
Anti-CD40, CHIR-12.12	$(2.41 \pm 0.13) \times 10^5$	$(1.24 \pm 0.06) \times 10^{-4}$	0.51 ± 0.02

Ejemplo 6: CHIR-5.9 y CHIR-12.12 son Potentes Antagonistas para la Proliferación Mediada por CD40 de Linfocitos Humanos de Sujetos Normales

El encaje del CD40 por el ligando CD40 induce la proliferación de las células B humana. Un anticuerpo anti-CD40 antagonista se espera que inhiba esta proliferación. Dos anticuerpos candidatos (CHIR-5.9 y CHIR-12.12) se ensayan por su capacidad para inhibir la proliferación por ligando CD40 de PBMC de sujetos humanos normales. Se utilizan ligando CD40 (CD40L) que expresan células CHO transfectantes fijas con formaldehído como una fuente de ligando CD40. Se cultiva PBMC Humano durante cuatro días con ligando CD40 que expresa células CHO fijas con formaldehído en la presencia de concentraciones variantes de anti-CD40 mAb CHIR-5.9 y CHIR-12.12. La proliferación se mide por incorporación de timidina tritiada. Las células se pulsan con timidina marcadas - tritiadas a 37° C durante 14-18 horas.

000176

Se encuentra que ambos anticuerpos son muy efectivos para inhibir la proliferación inducida por ligando CD40 PBMC humano (Tabla 4A, mAb CHIR-5.9, Tabla 4B, mAb CHIR-12.12). El experimento se desarrolla con múltiples donantes de PBMC (n=12 para CHIR-5.9 y n=2 para CHIR-12.12) para asegurar que la inhibición observada no fue una peculiaridad de las células de un donante sencillo. Luego de las evaluaciones con cuatro donantes adicionales de PBMC se llevó a cabo para mAb CHIR-12.12 con similares tendencias observadas. Un amplio rango de concentraciones de anticuerpo (0.01 µg/ml a 100 µg/ml) se utiliza en estos ensayos. Cerca de la inhibición completa de la proliferación inducida por el ligando CD40 se puede alcanzar en 0.1 µg/ml de concentración de anticuerpos en la mayoría de los casos. La concentración de anticuerpos (pM) para inhibir el 50% de proliferación de linfocitos inducidos por ligando CD40 (IC50) para linfocitos de seis donantes produjo un promedio IC50 (pM) de 47 (SD=21; donante 1, 24; donante 2, 66; donante 3, 45; donante 4, 84; donante 5, 30; donante 6, 35), que compara favorablemente con el promedio IC50 (pM) de 49.65 mostrado en la Tabla 4B. Basado en los datos actuales establecidos, ambos anticuerpos candidatos parecen similares en su potencia para la inhibición de proliferación inducida por el ligando CD40 de PBMC normal.

Tabla 4A. Efecto de mAb CHIR-5.9 en proliferación PBMC
inducida por CD40L

Exp#	solo PBMC	solo CHO-CD40L	PBMC+ CHO-CD40L	Conc. Abs. (μ g/ml)	hulG1		CHIR-5.9	
					CPM	% de inhibición	CPM	% de inhibición
PBMC-010	1851	121	4436	1	5080	-26	2622	74
	1851	121	4436	0.25	5498	-43	2907	62
	1851	121	4436	0.0625	6029	-65	2619	74
	1851	121	4436	0.0156	5814	-56	1199	131
PBMC-011 Donador # 1	2162	178	8222	10	13137	-84	2252	101
	2162	178	8222	1	11785	-61	1438	115
	2162	178	8222	0.1	10758	-43	1249	119
	2162	178	8222	0.01	11322	-53	4705	60
Donador # 2	2216	294	7873	10	16679	-164	2362	103
	2216	294	7873	1	14148	-117	1202	124
	2216	294	7873	0.1	12422	-85	756	133
	2216	294	7873	0.01	13870	-112	6606	24
Donador # 3	2396	241	11021	10	11641	-7	2631	100
	2396	241	11021	1	13528	-30	1450	114
	2396	241	11021	0.1	12176	-14	990	120
	2396	241	11021	0.01	11895	-10	5357	68
Donador # 4	4552	133	15301	10	22098	-64	3768	109
	4552	133	15301	1	19448	-39	2040	125
	4552	133	15301	0.1	18398	-29	1728	128
	4552	133	15301	0.01	22767	-70	9481	55
PBMC-012	777	117	6041	10	7327	-25	2150	76
	777	117	6041	1	6212	-3	1550	87
	777	117	6041	0.1	7006	-19	828	101
	777	117	6041	0.01	7524	-29	1213	94
PBMC-014	1857	73	7889	100	8399	-25	3379	76
	1857	73	7889	20	8120	-4	3870	67
	1857	73	7889	4	8368	-8	2552	90
	1857	73	7889	0.8	9564	-28	1725	103
PBMC-015 Donador # 1	3203	127	10485	100	15425	-69	1497	126
	3203	127	10485	20	11497	-14	1611	124
	3203	127	10485	4	11841	-16	1359	128
	3203	127	10485	0.8	12807	-32	1490	126
Donador # 2	3680	175	15145	100	21432	-56	1792	118
	3680	175	15145	20	16998	-16	1779	118
	3680	175	15145	4	17729	-23	1985	117
	3680	175	15145	0.8	17245	-19	2217	115
Donador # 3	2734	152	19775	100	22967	-19	1664	107
	2734	152	19775	20	21224	-9	1848	106
	2734	152	19775	4	20658	-5	1534	108
	2734	152	19775	0.8	18923	5	1262	110
PBMC-016	1118	36	13531	0.1	10928	21	745	103
	1118	36	13531	0.05	11467	17	962	102
	1118	36	13531	0.01	11942	13	3013	85
PBMC-017	962	75	12510	1	13597	-9	258	107

000178

Promedio de % de inhibición de PBMC humano a 100 µg/ml	-42	107
Promedio de % de inhibición de PBMC humano a 10 µg/ml	-69	98
Promedio de % de inhibición de PBMC humano a 1 µg/ml	-41	107
Promedio de % de inhibición de PBMC humano a 0.1 µg/ml	-28	117
Promedio de % de inhibición de PBMC humano a 0.01 µg/ml	-44	64
Promedio de % de inhibición de PBMC humano	-35	101

% de inhibición:

$$100 - \frac{\text{CPM con Abs-PBMC solo} - \text{CHO-CD40L solo}}{\text{CPM de PBMC} + \text{CHO-CD40L-PBMC solo} - \text{CHO-CD40L solo}} \times 100\%$$

Tabla 4B. Efecto de CHIR-12.12 mAB sobre proliferación PBMC inducida por CD40L									
Exp#		solo PBMC	solo CHO-CD40L	PBMC+ CHO-CD40L	Conc. Abs. (µg/ml)	HulG1 % de inhibición	CHIR-12.12 % de inhibición	IC50(nM)	
PBMC-025	Donador # 1	4051	32	42282	0.1	33254	23	440	110
		4051	32	42282	0.01	37129	14	8996	88
		4051	32	42282	0.001	40271	5	32875	25
		4051	32	42282	0.0001	40034	6	37281	13
	Donador # 2	2260	31	14887	0.1	15767	-6	395	115
		2260	31	14887	0.01	17134	-17	6734	65
		2260	31	14887	0.001	20142	-41	18183	-9
		2260	31	14887	0.0001	17847	-23	16187	-8
	Donador # 1	2039	35	19071	0.1	17136	11	624	109
		2039	35	19071	0.01	16445	15	6455	74
		2039	35	19071	0.001	16165	17	17833	7
		2039	35	19071	0.0001	18152	5	17924	7
PBMC-025	Donador # 2	2016	64	17834	0.1	17161	4	2078	100
		2016	64	17834	0.01	16757	7	10946	44
		2016	64	17834	0.001	18613	-5	17924	-1
		2016	64	17834	0.0001	17169	4	19560	-5
PBMC-025	Donador # 1	4268	45	22547	1	18204	24	2098	112
		4268	45	22547	0.1	20678	10	1827	114
		4268	45	22547	0.01	22795	-1	6520	88
		4268	45	22547	0.001	23547	-5	22327	1
	Donador # 2	4268	45	22547	0.0001	24775	-12	24124	-9
		2148	56	54894	1	48545	12	5199	94
		2148	56	54894	0.1	45708	17	5091	95
		2148	56	54894	0.01	51741	6	18990	68
		2148	56	54894	0.001	52421	5	50878	7
		2148	56	54894	0.0001	54770	0	62381	4
PBMC-029	Donador # 1	609	69	10054	0.1	11037	-10	2099	85
		609	69	10054	0.01	10037	0	1827	88
		609	69	10054	0.001	10222	-2	6520	38
		609	69	10054	0.0001	11267	-13	22327	-131
	Donador # 2	7737	57	23132	0.1	21254	12	2536	134
		7737	57	23132	0.01	21736	9	10249	84
		7737	57	23132	0.001	22676	4	23380	-2
		7737	57	23132	0.0001	22461	4	23183	0
PBMC-030	Donador # 1	2739	47	53426	0.1	60116	-13	2132	101
		2739	47	53426	0.01	56411	-6	14237	77
		2739	47	53426	0.001	59167	-11	85060	-5
		2739	47	53426	0.0001	56250	-12	60965	-15
	Donador # 2	4310	50	53781	0.1	52881	2	3209	102
		4310	50	53781	0.01	51741	4	30718	47
		4310	50	53781	0.001	53072	1	53528	0
		4310	50	53781	0.0001	53045	-9	54343	-1
PBMC-032	Donador # 1	2458	42	14058	0.1	18879	-22	636	116
		2458	42	14058	0.01	18250	-45	3358	93
		2458	42	14058	0.001	19852	-50	20639	-57
		2458	42	14058	0.0001	19161	-44	18907	-42

000'80

Promedio de % de inhibición de PBMC humano a 0.1 µg/ml	3	107	
Promedio de % de inhibición de PBMC humano a 0.01 µg/ml	-1	74	
Promedio de % de inhibición de PBMC humano a 0.001 µg/ml	-7	0	
Promedio de % de inhibición de PBMC humano a 0.0001 µg/ml	-8	-17	49.65
Promedio de % de inhibición de PBMC humano			
% de inhibición: 100-(CPM con PBMC Abs.-solo-CHO-CD40L) (CPM de PBMC+CHO-CD40L-solo PB,C-solo CHO-CD40L)*100%			

En adición a las células B, el PBMC humano también contiene células asesinas naturales que pueden mediar el anticuerpo dependiendo de la citotoxicidad (ADCC). Para clarificar el mecanismo de la inhibición mediada por el anticuerpo de proliferación, se desarrollan ensayos con células B purificadas a partir de PBMC humano. Similar a los resultados obtenidos con el PBMC, ambos anticuerpos inhiben potencialmente la proliferación inducida por ligando CD40 de células B purificadas (Tabla 5, n=3). Estos datos demuestran que la actividad antagonista de los anticuerpos candidato, y no el mecanismo de ADCC, es la causa de inhibición de proliferación en estos ensayos.

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

000'00'

Exp.	Donador	CPM			Conc. Abs. (µg/ml)	HuIgG1		CHIR-5.9		CHIR-12.12	
		Células B	CHO- CD40L	Células B+ CHO- CD40L		CPM	% inhibición	CPM	% inhibición	CPM	% inhibición
Células B 004	1	418	89	3132	100	429	103	271	109	152	114
		418	89	3132	20	3193	-2	316	107	222	111
		418	89	3132	4	3175	-2	144	114	235	110
		418	89	3132	0.8	6354	-122	245	110	63	117
	2	81	73	27240	100	28311	-4	85	100	77	100
		81	73	27240	20	24707	9	65	100	94	100
		81	73	27240	4	23081	15	108	100	68	100
		81	73	27240	0.8	26252	4	87	100	77	100
Células B 005	3	267	75	24352	1	25910	-6	291	100	102	101
		267	75	24352	0.1	28447	-16	259	100	108	101
		267	75	24352	0.01	26706	-9	2957	89	4922	81
Promedio de % de inhibición							-3		103		103

% de inhibición: 100-(CPM con células Abs-B solo-CHO-CD40L solo)/(CPM de célula B con células CHO-CD40L-B solo-CHO-CD40L solo)*100%

Ejemplo 7: CHIR-5.9 y CHIR-12.12 no Inducen fuerte Proliferación de células B humanas de Sujetos Normales

El ligando CD40 activa células B normales y células de linfoma de células B para proliferar. La unión de algunos anticuerpos anti-CD40 (agonista) pueden suministrar una señal estimuladora similar para la proliferación de células B normales y de cáncer. Anticuerpos con fuerte actividad estimuladora de célula B no son candidatos adecuados para tratamiento terapéutico de linfomas de célula B. Se ensayan los dos anticuerpos candidatos por su capacidad de inducir la proliferación de células B de donantes voluntarios normales. Las células B purificadas por centrifugación de gradiente Ficoll-Hypaque Plus de PBMC donante normal se cultivan en placas de 96 pozos con concentraciones variantes de anticuerpos candidato (rango de 0.001 a 100 µg/ml) para un total de cuatro días. En el grupo de

control positivo, se cultiva PBMC con células CHO fijas con formaldehído que expresan el ligando CD40. La proliferación de células B se mide mediante la incorporación de timidina marcada tritiada a 37° C durante 14-18 horas. Mientras el ligando CD40 presente en células CHO induce proliferación vigorosa de células B que resultan en un índice de estimulación promedio (SI) de 145, los anticuerpos candidato inducen solo una débil proliferación con un índice de estimulación de 2.89 y 5.08 para CHIR-12.12 y CHIR-5.9 , respectivamente (n=3) (Tabla 6).

Tabla 6. Proliferación de células B purificadas a partir de sujetos humanos normales en respuesta a anti-CD40 mAbs candidato

Exp#	Donador #	Células B	Células B+CHO-CD40L		Conc. Abs. (µg/ml)	Células B+hulgG1		Células B+CHIR 5.9		Células B+CHIR 12.12	
		CPM	CPM	Índice S(1)		CPM	Índice S(2)	CPM	(2)	CPM	Índice S(2)
Células B 004 Congeladas	1	418	3132	7.49	100	498	1.19	401	0.96	458	1.10
		418	3132		20	245	0.59	232	0.56	370	0.89
		418	3132		4	241	0.58	232	0.56	211	0.50
		418	3132		0.8	376	0.90	298	0.71	230	0.55
Congelado	2	81	27240	336.30	100	34	0.42	454	5.60	122	1.51
		81	27240		20	48	0.59	706	8.72	255	3.15
		81	27240		4	41	0.51	567	7.00	367	4.53
		81	27240		0.8	34	0.42	736	9.09	408	5.04
Células B 005	3	267	24552	91.96	1	691	2.59	2101	7.87	1223	4.58
		267	24552		0.1	686	2.57	2267	8.49	1557	5.83
		267	24552		0.01	808	3.03	2203	8.25	1027	3.85
		267	24552		0.001	567	2.12	846	3.17	826	3.09
Promedio de Índice de Estimulación (SI) 145.25							1.29	5.08	2.88		
Índice S (1)= CPM (Células B+CHO-CD40L)/CPM (solo células B)											
Índice S (2)= CPM (Células B+Abs.)/CPM (solo PBMC)											

Adicionalmente a las células B, los tipos de células que contienen PBMC humano que llevan los receptores Fc (FcR) para las moléculas IgG1 que pueden suministrar reticulación de anticuerpos

anti-CD40 se unen al CD40 en las células B. Esta reticulación puede potencialmente mejorar la actividad estimuladora de los anticuerpos anti-CD40. Para confirmar la falta de actividad estimuladora de la célula B de los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 en la presencia de células reticuladoras, los experimentos de proliferación se desarrollan con PBMC total que contiene células B así como también células FcR+. Los datos de estos experimentos (Tabla 7A, mAb CHIR-5.9; Tabla 7B, mAb CHIR-12.12), confirman que estos anticuerpos candidato aún en la presencia de células que llevan FcR en general no estimulan las células B para proliferar sobre el fondo de proliferación inducido por el IgG1 humano de control (n=10). El ligando CD40 induce un índice de estimulación promedio (SI) SI de 7.41. El promedio SI con anticuerpos candidato fue de 0.55 y 1.05 para CHIR-12.12 y CHIR-5.9, respectivamente. Solo uno de los 10 donantes PBMC ensayados mostró alguna respuesta estimulante para anticuerpo CHIR-5.9 (donante # 2 en Tabla 7). La falta de actividad estimuladora por el mAbs candidato se confirmó adicionalmente al medir la proliferación PBMC en respuesta a los anticuerpos anti-CD40 candidato inmovilizados sobre la superficie plástica de pozos cultivados (n=2).

Tabla 7A. Proliferación de PBMC de sujetos humanos normales en respuesta a mAb CHIR-5.9.

Exp#		PBM C	PBMC+CHO-CD40L		Cons. Abs. (μ g/ml)	PBMC+hulIgG1		PBMC+CHIR-5.9	
			CPM	Índice (1)		CPM	Índice (2)	CP M	Índice (2)
PBMC-010		1417	5279	3.73	1	1218	0.86	597 3	4.22
		1417	5279		0.25	1712	1.21	481 5	3.40
		1417	5279		0.062	1449	1.02	364 2	2.57
		1417	5279		0.015	1194	0.84	324 2	2.29
PBMC-011	Donador #1	2138	8247	3.86	10	3047	1.43	317 7	1.49
		2138	8247		1	2726	1.28	361 7	1.69
		2138	8247		0.1	2026	0.95	201 1	0.94
		2138	8247		0.01	2424	1.13	186 0	0.87
	Donador #2	1156						452	
		2374	1	4.87	10	4966	2.09	3	1.91
		1156						244	
		2374	1		1	2544	1.07	5	1.03
		1156						146	
		2374	1		0.1	2177	0.92	2	0.62
	Donador #3	1156						189	
		2374	1		0.01	4672	1.97	6	0.80
		3229	7956	2.46	10	5035	1.56	211 9	0.66
		3229	7956		1	2826	0.88	109 9	0.34
	Donador #4	3229	7956		0.1	2277	0.71	105 2	0.33
		3229	7956		0.01	3078	0.95	189 9	0.59
		1431						517	
		4198	4	3.41	10	5012	1.19	6	1.23
		1431						470	
		4198	4		1	3592	0.86	2	1.12
PBMC-014		1431						431	
		4198	4		0.1	5298	1.26	9	1.03
		1431						540	
		4198	4		0.01	5758	1.37	0	1.29
PBMC-015		2350	8787	3.74	100	2722	1.16	247 1	1.05
		2350	8787		20	2315	0.99	244 7	1.04
		2350	8787		4	2160	0.92	165 9	0.71
		2350	8787		0.8	2328	0.99	167 1	0.71
PBMC-015	Donador #1	1293						168	
		3284	6	3.94	100	3598	1.10	2	0.51
		1293						156	
		3284	6		20	2751	0.84	2	0.48
		1293						110	
		3284	6		4	3135	0.95	5	0.34
	Donador #2	1293						141	
		3284	6		0.8	4027	1.23	9	0.43
		1912						510	
		6099	1	3.14	100	2999	0.49	4	0.84

	1912					391	
	6099 1		20	4025	0.66	7	0.64
	1912					334	
	6099 1		4	4496	0.74	1	0.55
	1912					413	
	6099 1		0.8	3834	0.63	9	0.68
Donador #3	1982					120	
	2479 6	8.00	100	3564	1.44	4	0.49
	1982					782	
	2479 6		20	1874	0.76		0.32
	1982					634	
	2479 6		4	1779	0.72		0.26
	1982					937	
	2479 6		0.8	2274	0.92		0.38
PBMC-016	1578					103	
	1148 9	13.75	0.1	1255	1.09	6	0.90
	1578					871	
	1148 9		0.05	1284	1.12		0.76
	1578					952	
	1148 9		0.01	1446	1.26		0.83
Promedio SI de PBMC		5.09			1.06		1.03

$$\text{índice}(1) : = (\text{PBMC} + \text{CHO} - \text{CD40L}) / \text{PBMC}$$

$$\text{índice}(2) : = (\text{PBMC} + \text{Abs}) / \text{PBMC}$$

000186

Tabla 7B. Proliferación de PBMC de sujetos humanos normales en respuesta a mAb CHIR-12.12.

Exp#		PBMC	PBMC+CHO-CD40L		Conc. Abs	PBMC+hulG1		PBMC+CHIR-12.12	
			CPM	Índice (1)	(µg/ml)	CPM	Índice (2)	CPM	Índice (2)
PBMC-025	Donador #1	4051	42292	10.44	0.1	2909	0.72	2451	0.61
		4051	42292		0.01	4725	1.17	8924	2.20
		4051	42292		0.001	8080	1.99	8782	2.17
		4051	42292		0.0001	4351	1.07	4342	1.07
	Donador #2	2260	14987	6.63	0.1	2538	1.12	6741	2.98
		2260	14987		0.01	3524	1.56	8921	3.95
		2260	14987		0.001	3159	1.40	4484	1.96
		2260	14987		0.0001	2801	1.24	2533	1.12
PBMC-026	Donador #1	2085	18313	8.78	0.1	1386	0.66	2761	1.32
		2085	18313		0.01	2871	1.38	3162	1.52
		2085	18313		0.001	2602	1.25	3233	1.55
		2085	18313		0.0001	1709	0.82	1766	0.85
	Donador #2	676	18054	28.71	0.1	660	0.98	2229	3.30
		676	18054		0.01	2864	4.24	1238	1.83
		676	18054		0.001	690	1.03	1507	2.23
		676	18054		0.0001	984	1.46	811	1.20
PBMC-027	Donador #1	2742	13028	4.75	0.1	4725	1.72	2795	1.02
		2742	13028		0.01	4575	1.67	5353	1.95
		2742	13028		0.001	3219	1.17	3501	1.28
		2742	13028		0.0001	5107	1.86	4272	1.56
	Donador #2	1338	11901	8.89	0.1	1633	1.22	1943	1.45
		1338	11901		0.01	1520	1.14	5132	3.84
		1338	11901		0.001	1517	1.13	2067	1.54
		1338	11901		0.0001	1047	0.78	2076	1.55
PBMC-028	Donador #1	4288	22547	5.26	0.1	3685	0.86	2525	0.59
		4288	22547		0.01	3113	0.73	2047	0.48

000187

		4286	22547		0.001	4414	1.03	3515	0.82
		4286	22547		0.0001	2452	0.57	4189	0.98
Donador #2		2146	54894	25.56	0.1	9127	4.25	5574	2.59
		2146	54894		0.01	4566	2.13	6515	3.03
		2146	54894		0.001	5285	2.46	5919	2.76
		2146	54894		0.0001	4667	2.17	4298	2.00
PBMC-029 Donador #1		609	10054	16.51	0.1	359	0.59	363	0.60
		609	10054		0.01	473	0.78	956	1.57
		609	10054		0.001	461	0.76	1159	1.90
		609	10054		0.0001	625	1.03	558	0.92
Donador #2		7737	23132	2.99	0.1	4940	0.64	3493	0.45
		7737	23132		0.01	6041	0.78	3644	0.47
		7737	23132		0.001	5098	0.66	5232	0.68
		7737	23132		0.0001	5135	0.66	5241	0.68
PBMC-030 Donador #1		4164	57205	11.74	10	2713	0.65	1046	0.25
		4164	57205		1	3627	0.87	1576	0.38
		4164	57205		0.1	4590	1.10	1512	0.36
		4164	57205		0.01	4384	1.05	2711	0.65
Donador #2		3324	53855	16.20	10	6376	1.92	4731	1.42
		3324	53855		1	4720	1.42	5219	1.57
		3324	53855		0.1	3880	1.17	5869	1.77
		3324	53855		0.01	3663	1.16	5657	1.70
PBMC-032 Donador #1		1808	15271	8.45	10	2149	1.30	4780	2.65
		1808	15271		1	3620	2.11	5203	2.88
		1808	15271		0.1	2098	1.16	6332	3.50
		1808	15271		0.01	1789	0.99	5005	2.77
Promedio SI de PBMC				11.92			1.30		1.62

índice

e(1): =CPM de (PBMC+CHO-CD40L)/CPM de PBMC

índice(2): =CPM de (PBMC+Abs)/CPM de PBMC

El promedio SI con el ligando CD40, CHIR-12.12 y estimulación CHIR-5.9 fue de 22, 0.67 y 1.2, respectivamente (Tabla 8). Tomados juntos estos datos muestran que los anticuerpos anti-CD40 candidatos no poseen fuertes propiedades estimuladoras de células B.

000188

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

Exp#	PBMC	PBMC+CHO-CD40L		(ug/ml)	PBMC+huIgG1		PBMC+CHIR-5.9		PBMC+CHIR-12.12	
	CPM	CPM	Índice S (1)		CPM	Índice S (2)	CPM	Índice S (2)	CPM	Índice S (2)
PBMC-012	225	6808	30.26	10	279	1.24	734	3.26	200	0.89
	225	6808		1	175	0.78	178	0.79	161	0.72
	225	6808		0.1	156	0.69	226	1.00	249	1.11
	225	6808		0.01	293	1.30	232	1.03	254	1.13
Inmovilizado 004	857	11701	13.65	1000	479	0.56	1428	1.67	384	0.45
	857	11701		100	543	0.63	839	0.98	265	0.31
	857	11701		10	487	0.57	411	0.48	262	0.31
	857	11701		1	632	0.74	372	0.43	376	0.44

Índice de Estimulación Promedio 21.96 0.81

1.21 0.67

S. índice(1): = CPM (PBMC+CHO-CD40L)/CPM (PBMC)

S. índice(2): = CPM (PBMC+mAbs)/CPM (PBMC)

Ejemplo 8: Elchi59 y CHIR-12.12 Son Capaces de Matar las Células Objetivo que Llevan CD40 por ADCC

Los anticuerpos candidato pueden matar células objetivo que llevan CD40 (líneas de linfomas) por el mecanismo de ADCC. Ambos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 son anticuerpos completamente humanos del isotipo IgG1 y se espera que tengan la capacidad para inducir la muerte de células objetivo mediante el mecanismo de ADCC. Ellas se ensayan por su capacidad para matar líneas de células de cáncer en ensayos *in vitro*. Dos líneas de células del linfoma humano (Ramos y Daudi) se seleccionan como células objetivo para estos ensayos. El PBMC o las células NK enriquecidas de 8 donantes voluntarios normales se utilizan como células efectoras

en estos ensayos. Una respuesta ADCC más potente se observa con CHIR-12.12 comparado con CHIR-5.9 contra ambas células objetivo de líneas de célula de cáncer de linfoma. Las líneas de células de linfoma también expresan CD20, el antígeno objetivo para rituximab (Rituxan®), que permite la comparación de la actividad ADCC de estos dos mAbs candidatos con actividad ADCC rituximab. Para el objetivo de la línea de célula de linfoma, se observa una lisis específica promedio de 35%, 59%, y 47% para CHIR-5.9, CHIR-12.12, y rituximab respectivamente cuando se utiliza en concentración de 1 µg/ml (Tabla 9). Los dos anticuerpos no muestran mucha actividad en ensayos de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC).

Tabla 9. Anti-CD40 mAb dependiente de la muerte de líneas de células de linfoma por ADCC.

mAB anti-CD40 dependiente de muerte de líneas celulares de linfoma por ADCC										
Exp#	Célula efectora	Propor- ción E:T	Células objetivo: líneas de célula de linfoma humano (Ramos o Daudi)							
			IgG1	Conc. Abs (μ g/ml)	CHIR-5.9		CHIR-12.12		Rituxan	
					% de lisis	% de lisis-% lisis IgG1	% de lisis	% de lisis-% lisis IgG1	% de lisis	% de lisis-% lisis IgG1
ADCC-005	huNK	3	17.05	5	30.75	13.70	65.22	48.17	ND	ND
Alamar Blue	huNK	3	40.81	5	58.62	17.81	87.87	47.06	ND	ND
ADCC-006	huNK	2	-3.09	10	3.50	6.59	43.71	46.8	34.82	37.91
Alamar Blue			-8.62	1	-10.10	-1.48	45.13	53.75	37.07	45.69
			-11	0.1	-14.80	-3.80	39.82	50.82	33.61	44.61
			-4.54	0.01	2.53	7.07	50.07	54.61	28.49	33.03
51Cr	huNK	5	1.5	10	32.09	30.59	47.24	45.742	ND	ND
			2.4	1	18.01	15.61	37.42	35.022	ND	ND
			2.5	0.1	14.67	12.17	37.63	35.131	ND	ND
ADCC-009	huNK	10	2.32	5	66.20	63.68	97.70	95.38	86.2	83.88
Calcein AM			0.48	1	67.20	66.72	123.00	122.52	88.2	87.72
			-1.43	0.2	78.40	79.83	118.00	119.43	88.8	90.23
			3.39	0.04	69.10	65.71	109.00	105.61	84.9	81.51
ADCC-011	huNK	8	3.18	1	15.36	12.19	51.59	48.42	22.44	19.27
Calcein AM			4.58	0.01	7.39	2.81	45.80	42.22	14.68	10.10
			5.41	0.002	6.35	0.94	5.10	-0.31	9.58	4.15
			7.03	0.0004	7.76	0.73	5.99	-1.04	5.99	-1.04
ADCC-012	huNK	10	13.34	10	73.31	59.97	117.80	104.46	50.75	37.41
Calcein AM			13.50	1	74.76	61.26	88.64	75.14	65.97	52.47
			12.27	0.01	58.52	46.25	72.88	60.61	50.16	37.89
			13.61	0.005	57.50	43.99	69.45	55.84	39.28	25.67
			11.95	0.001	56.81	44.86	65.17	53.22	33.07	21.12
ADCC-013	PBMC	100	2.54	1	21.03	18.49	37.94	35.40	32.28	29.74
51Cr			2.45	0.1	15.50	13.05	30.82	28.37	27.18	24.73
			2.92	0.01	14.53	11.61	22.59	19.67	12.79	9.87
			2.78	0.001	3.90	1.12	8.99	6.21	3.13	0.35
ADCC-014	PBMC	100	4.64	10	53.54	48.90	56.12	51.48	ND	ND
51Cr			4.64	1	46.84	42.20	43.00	38.36	ND	ND
			4.64	0.1	45.63	40.99	39.94	35.30	ND	ND
			4.64	0.01	7.73	3.09	9.79	5.15	ND	ND
			4.64	0.001	8.83	4.19	10.81	6.17	ND	ND
Promedio de % de lisis a 1 μ g/ml de concentración de mAb						35.51		59.03		47.23
El grado mayor de muerte 100% se debe a la muerte incompleta por usar detergente para el control de muerte de 100%.										

Ejemplo 9: El CD40 Está Presente en la Superficie de Células
NHL de Pacientes de Biopsia de Nodo Linfático

000111

Se aislaron células NHL de nodos linfáticos de biopsia de pacientes y se preservan en nitrógeno líquido hasta su uso. La viabilidad celular al tiempo del análisis excede el 90%. Se tiñen las células de dos pacientes resistentes al rituximab y sensibles al rituximab (cinco pacientes en total) con una marca directa 15B8-FITC o 15B8 más anti-hIgG₂-FITC y analizados por citometría de flujo. Las células NHL de todos los pacientes se encuentra que expresan el CD40. La Tabla 10 muestra que un promedio de 76% de células NHL expresa CD40 (un rango de 60-91%).

Tabla 10.

Paciente ID ^a	Paciente tipo ^b	% positivo ^c	
		MS81 ^d	15B8 ^e
B	CR	n.d. ^f	91.02
J	CR	n.d.	60.36
H	NR	n.d.	85.08
H	NR	72.24	81.19
K	NR	n.d.	70.69
L	NR	n.d.	66.82

Promedio % positivo

^a Pacientes NHL tratados con anti-CD20 mAb

^b Respuesta de paciente para anti-CD20 mAb; CR=respuesta completa; NR=sin respuesta

^c % de células en puerta de linfocito que tiñe positivo

^d MS81, agonista anti-CD40 mAb

^e 15B8, antagonista anti-CD40 mAb

^f n.d., no hecho

000¹ * 2

Ejemplo 10: El CHIR-5.9 y CHIR-12.12 No Estimulan la Proliferación de Células de Cáncer de los Nodos Linfáticos de Pacientes NHL

Se conoce que el ligando CD40 proporciona una señal estimuladora para la proliferación y supervivencia de células de linfoma de pacientes NHL. La unión de algunos anticuerpos anti-CD40 (agonista) puede suministrar una señal estimuladora similar para la proliferación de células cancerígenas de pacientes. Los anticuerpos con fuerte actividad estimuladora de célula B no son candidatos adecuados para tratamiento terapéutico de linfomas de célula B. Se ensayan los dos anticuerpos candidato para su capacidad de inducir proliferación de células NHL de tres pacientes. Las células se aíslan de biopsia de nodo linfático (LN) cultivadas con concentraciones que varían de anticuerpo de candidato (rango de 0.01 a 300 µg/ml) para un total de tres días. La proliferación de células se mide por la incorporación de timidina tritiada. Ninguno de los dos candidatos mAbs induce alguna proliferación de células de cáncer en ninguna concentración ensayada (Tabla 11). Los anticuerpos aún en la presencia de IL-4 agregado exógenamente, un factor de crecimiento de célula B no induce proliferación de células NHL (ensayados en una de las células de los tres pacientes). Estos resultados indican que el CHIR-5.9 y CHIR-12.12 no son anticuerpos anti-CD40 agonista y no estimulan la proliferación *in vitro* de células NHL de pacientes.

000103

Tabla 11. Proliferación de células de cáncer de pacientes LN o NHL en respuesta a anti-CD40 mAbs candidato

Donador #	Conc. Abs. (µg/ml)	CPM		CHIR-5.9	Células CPM+ CHIR 12.12	CHIR-12.12	CPM	MS81
		Células + IgG	Célula + CHIR-5.9				Células + MS81	
PP	0.01	180	203	1.23	133.67	0.74	ND	ND
	0.1	107.5	151.67	1.41	136	1.27	ND	ND
	1	130.67	206.67	1.58	197.33	1.51	179	1.37
	10	152.5	245	1.61	137.33	0.90	871.67	5.71
	100	137.67	332.33	2.41	157.33	1.14	ND	ND
	300	137.67	254.33	1.85	100.67	0.73	ND	ND
MM	0.01	165	180.33	1.09	124	0.75	ND	ND
	0.1	180.5	149.67	0.83	111.33	0.62	ND	ND
	1	62	109.67	1.77	104.67	1.69	ND	ND
	10	91.5	93.33	1.02	100	1.09	763	8.34
	100	123	173	1.41	105.33	0.86	ND	ND
	300	109	183.67	1.69	157	1.44	ND	ND
BD (IL-4)	0.01	1591.5	1623.67	1.02	1422	0.89	ND	ND
	0.1	1405	1281	0.91	1316.33	0.94	ND	ND
	1	1526	1352.33	0.89	1160	0.76	1508.33	0.99
	10	1450	1424	0.98	1244	0.86	4146.67	2.86
	100	1406.67	1497.67	1.06	1255.33	0.89	ND	ND
	300	1410.33	1466.67	1.04	1233	0.87	ND	ND

Ejemplo 11: CHIR-5.9 y CHIR-12.12 Pueden Bloquear la Proliferación Mediada por Ligando CD40 de Células de Cáncer de Pacientes de Linfoma No-Hodgkin

El encaje de CD40 por el ligando CD40 induce la proliferación de células de cáncer de pacientes NHL. Un anticuerpo anti-CD40 antagonista se espera que inhiba esta proliferación. Los dos anticuerpos anti-CD40 candidato se ensayan

000111

en concentraciones variantes (0.01 µg/ml a 100 µg/ml) para su capacidad de inhibir proliferación inducida por el ligando CD40 de células NHL de pacientes. Las células NHL de pacientes se cultivan en suspensión sobre alimentador que expresa CD40L en la presencia de IL-4. La proliferación de célula NHL se mide por la incorporación de ³H-timidina. Ambos anticuerpos se encuentra que son muy efectivos para inhibir la proliferación inducida por el ligando CD40 de las células NHL (Tabla 12, n=2). Cercano a completar la inhibición de la proliferación inducida por el ligando CD40 se puede alcanzar en concentración de 1.0 a 10 µg/ml de anticuerpos.

Tabla 12: Inhibición de proliferación inducida por ligando CD40 de células de cáncer de pacientes NL o NHL.

Paciente	(µg/ml)	CPM	CHIR-5.9		CHIR-12.12		Rituximab	
		IgG1	CPM	% inhibición	CPM	% inhibición	CPM	% inhibición
BD	0.01	29525.5	25369	14	24793	16	29490.3	0
	0.1	29554	20265.33	31	13671	54	29832.7	-1
	1	29486.67	6785.33	77	453	98	26355.3	11
	10	29710	506.33	98	371	99	29427.3	1
	100	29372.33	512.33	98	386.67	99	ND	ND
PP	0.01	23572	23229.33	1	23666	0	25317.3	-7
	0.1	22520	19092.33	15	17197	24	26349.7	-17
	1	23535.67	1442.33	94	802.67	97	26515.7	-13
	10	23101.5	608.67	97	221.33	99	25478.3	-10
	100	23847.33	ND	ND	252	99	ND	ND

% de inhibición: $100 - (\text{CPM con ensayo Abs} / \text{CPM con control mAb}) * 100\%$

000'05

Ejemplo 12: Efecto del CHIR-5.9 sobre un Número Variable de Células NHL Cuando se Cultivan con Células que Llevan el Ligando CD40

Efectos del CHIR-5.9 en los números de células NHL variables cuando se cultivan con células que llevan el ligando CD40 durante un período extendido de tiempo (7, 10, y 14 días) se investiga. La señalización mediada por el ligando CD40 a través del CD40 es importante para la supervivencia de las células B. Este conjunto de experimentos evalúa el efecto de anticuerpos anti-CD40 de números de células NHL en 7, 10, y 14 días. Las células NHL de cinco pacientes se cultivan en suspensión sobre células de alimentador irradiadas que expresan CD40L en la presencia de IL-4. Los anticuerpos IgG humano de control y CHIR-5.9 se agregan en concentraciones de 10 µg/ml en el día 0 y en el día 7. Las células viables bajo cada condición se cuentan en el día específico. Números de células en el grupo de control (IgG) se incrementan con el tiempo según se espera. Números reducidos de células se recuperan de cultivos tratados con CHIR-5.9 comparado con el grupo de control. Los niveles más grandes de reducción en número de células por el anticuerpo CHIR-5.9 se observan en el día 14 y eran en promedio 80.5% (un rango de 49-94%) comparado con isotipo de control (n=5). Estos datos se resumen en la Tabla 13.

000196

Tabla 13: Efecto de anticuerpo anti-CD40 (CHIR-5.9/5.11) en números de células de pacientes NH durante período de cultivo prolongado (7, 10, y 14 días)

Paciente	Días en Cultivo	Números de células viables		% de reducción comparado con control IgG
		IgG	mAb CHIR-5.9/5.11	
PS	0	100000	1000000	0.00
	7	0	447500	52.14
	10	935000	504100	60.34
	14	127090	525000	48.98
		102910		
MT	0	100000	1000000	0.00
	7	0	182500	31.80
	10	267600	191600	71.96
	14	683400	225000	84.48
		145000		
BRF	0	250000	250000	0.00
	7	145000	86667	40.23
	10	207500	65000	68.67
	14	570500	33330	94.16
DP	0	250000	250000	0.00
	7	188330	136670	27.43
	10	235000	128330	45.39
	14	428330	58330	86.38
PP	0	250000	250000	0.00
	7	270000	176670	34.57
	10	311670	128330	58.83
	14	458330	53330	88.36

* % de reducción comparado con ctrl Abs=100-(ensayo Abs/ctrl Abs)*100

000197

Ejemplo 13: CHIR-5.9 y CHIR-12.12 Son Capaces de Matar Células de Cáncer de los Nodos Linfáticos de Pacientes NHL por ADCC

Ambos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 son anticuerpos completamente humanos del isotipo IgG₁ y se muestran por inducir la muerte de las líneas de célula de linfoma *in vitro* por el mecanismo de ADCC (Tabla 9). Ellas se ensayan por su capacidad de matar células de cáncer de un paciente NHL sencillo en ensayos *in vitro*. Se utilizan células NK enriquecidas de donantes voluntarios normales ya sea frescas después de aislamiento o después de cultivo durante la noche a 37° C como células efectoras en este ensayo. Se obtienen resultados similares con células NK aisladas frescamente y células NK utilizadas después de cultivo durante la noche. Se observa un nivel más grande de ADCC con CHIR-12.12 comparado con CHIR-5.9 contra las células NHL del paciente. Las células NHL también expresan CD20, el antígeno objetivo para rituximab (Rituxan®), que permite la comparación de la actividad ADCC de estos dos mAbs candidatos con rituximab. El anticuerpo CHIR-12.12 y rituximab muestran nivel similar de actividad ADCC con CHIR-5.9 que se clasifica más adelante en este ensayo. Estos datos se muestran en la Figura 3A y 3B.

Ejemplo 14: CHIR-5.9 y CHIR-12.12 Pueden Bloquear la Proliferación y Supervivencia Mediada por CD40 de Células de Cáncer de Pacientes CLL

000198

Los anticuerpos candidatos pueden bloquear la proliferación y supervivencia mediada por CD40 de células de cáncer de pacientes CLL. Las células CLL de pacientes se cultivan en suspensión sobre células CHO fijas con formaldehído que expresan CD40L bajo dos diferentes condiciones: Adición de IgG de anticuerpo de isotipo humano (control); y adición de anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12. Todos los anticuerpos se agregan en concentraciones de 1, 10, y 100 µg/ml en ausencia de IL-4. Se desarrollan los conteos de células en 24 y 48 h por ensayo MTS. Números reducidos de células se recuperan de CHIR-5.9 (n=6) y CHIR-12.12 (n=2) cultivos tratados comparadas con el grupo de control. Las mayores diferencias en los números de células entre cultivos tratados con anticuerpo de control y tratados con anti-CD40 mAb se ven en el punto de tiempo 48-h. Estos datos se resumen en la Tabla 14.

Tabla 14. El efecto de anticuerpos candidatos sobre la proliferación y supervivencia inducida por CD40 de células de cáncer de pacientes CLL medidos a 48 h después de la iniciación de cultivo

000'09

Paciente #	Conc. Abs. (µg/ml)	Número relativo de células			% de reducción en números de células*	
		IgG1	CHIR-5.9/5.11	CHIR-12.12	CHIR-5.9/5.11	CHIR-12.12
1	1	269.3				
		1	25.27	ND	90.62	ND
	10	101.5				
		8	33.07	ND	67.44	ND
2	100	130.7				
		1	40.16	ND	69.28	ND
	1	265.5				
		5	75.8	ND	71.46	ND
3	10	227.5				
		7	128.5	ND	43.53	ND
	100	265.9				
		9	6.4	ND	97.59	ND
4	1	85.9				
		35.39	ND	58.80	ND	
	10	70.44				
		39.51	ND	43.91	ND	
5	100	77.65				
		20.95	ND	73.02	ND	
	1	80.48				
		15.03	ND	81.32	ND	
6	10	63.01				
		19.51	ND	69.04	ND	
	100	55.69				
		3.65	ND	93.45	ND	
7	1	90.63				
		91.66	89.59	-1.14	1.15	
	10	78.13				
		82.28	60.41	-5.31	22.68	
8	100	63.53				
		86.47	39.59	-36.11	37.68	
	1	130.2				
		1	77.6	71.88	40.40	44.80
9	10	131.7				
		7	78.13	73.96	40.71	43.87
	100	127.0				
		8	76.56	82.29	39.75	35.25

* % de reducción comparado con Abs de control = 100-(Ensayo Abs/control Abs)*100

Ejemplo 15: El CHIR-5.9 y CHIR-12.12 Muestran Actividad Anti-Tumor en Modelos Animales

Eficacia de farmacología/in vivo

000200

Se espera que mAbs candidato produzca efectos farmacológicos deseados para reducir los límites de tumor por cualquiera/ambos de dos mecanismos anti-tumor, bloqueamiento de la proliferación/supervivencia de señal e inducción de ADCC. Los modelos de xenoingerto de linfoma humano disponibles actualmente utilizan líneas de células de linfoma de largo plazo que, en contraste con las células de cáncer primario no dependen de la estimulación CD40 para su crecimiento y supervivencia.

Por lo tanto, el componente de esta actividad anti-tumor del mAbs basado en el bloqueamiento de la señal de proliferación/supervivencia del tumor no se espera que contribuya a la eficacia anti-tumor en estos modelos. La eficacia en estos modelos es dependiente del ADCC, el segundo mecanismo anti-tumor asociado con el CHIR-5.9 y el CHIR-12.12 mAbs. Dos modelos de linfoma humano de xenoingerto basado en líneas de células Namalwa y Daudi se evalúan para actividades anti-tumor de mAbs candidato. Para demostrar adicionalmente su actividad terapéutica, se evalúan estos mAbs candidatos en un modelo de linfoma humano de xenoingerto representado y no representado basado en la línea de célula Daudi.

Resumen de los datos de eficacia in vivo

Cuando se administra intraperitonealmente (i.p.) una vez a la semana para un total de 3 dosis, CHIR-12.12, uno de los dos mAbs candidato, inhibe significativamente el crecimiento del

000201

linfoma de célula B no representado agresivo (Namalwa) en una forma dependiente de dosis (Figura 4). Se ensaya el segundo candidato mAb, CHIR-5.9, solo en una dosis sencilla en este estudio y fue menos efectiva que el CHIR-12.12 en la misma dosis. De forma interesante, se encuentra que el CHIR-12.12 es más eficaz en este modelo que el rituximab. Es posible que la menor eficacia del rituximab se pueda deber a la baja expresión CD20 en la línea de célula de linfoma Namalwa. La eficacia observada con el mAbs candidato tiene mayor importancia en razón a que solo uno de los dos mecanismos de muerte de célula de cáncer (ADCC) es operativo en el modelo del linfoma del xenoingerto actual. Dos mecanismos de muerte, ADCC y bloqueo de señal de supervivencia, se espera que contribuyan a las actividades anti-tumor en pacientes de linfoma humano. Esto es probablemente para incrementar la oportunidad de alcanzar eficacia en pacientes con linfoma humano. El anti-CD40 mAbs candidato también muestra una tendencia hacia la inhibición de crecimiento de tumor en un segundo modelo de linfoma de célula B (modelo Daudi no validado, no se muestran datos). En los estudios que siguen, los dos anticuerpo candidato se muestran por tener eficacia anti-tumor dependiente de la dosis en ambos modelos de linfoma Daudi representado y no representado (Figuras 5 y 6, respectivamente). En el modelo Daudi representado, el CHIR-12.12 mAb fue más eficaz en la reducción del volumen de tumor que tuvo una dosis similar de Rituxam®.

000000

Modelos de linfoma de célula B humana de xenoingerto

Para asegurar el crecimiento consistente del tumor, se irradian ratones desnudos de células T deficientes a todo el cuerpo en 3 Gy para suprimir adicionalmente el sistema inmune un día antes de la inoculación del tumor. El tratamiento se inicia un día después de la implantación del tumor (modelos de linfoma de célula B humano de xenoingerto subcutáneo no representada, Namalwa y Daudi) o cuando el volumen de tumor alcanza 200-400 mm³ (modelo Daudi representado, usualmente 15 días después de inoculación de tumor). Los ratones que llevan el tumor se inyectan intraperitonealmente con anti-CD40 mAbs (i.p.) una vez una semana en las dosis indicadas. Se registran los volúmenes de tumor dos veces por semana. Cuando el volumen de tumor en cualquier grupo alcanza 2500 mm³, se termina el estudio. Nótese que en el modelo Daudi representado los datos de volumen de tumor se analizan hasta el día 36 debido a la muerte de algunos ratones después de ese día. La regresión completa (CR) se cuenta hasta el final del estudio. Se analizan los datos utilizando ensayo Kruskal-Wallis o ANOVA y corresponde al post ensayo para comparación multigrupo. En el modelo Namalwa no representado, el anti-CD40 mAb CHIR-12.12, pero no Rituxan® (rituximab), inhibe significativamente ($p < 0.01$) el crecimiento de los tumores Namalwa (reducción de volumen de tumor de 60% versus 25% para rituximab, n=10 ratones/grupo) (Figura 4). Así, en este modelo, el anti-CD40 mAb CHIR-12.12 fue más potente que el rituximab. Es valioso notar que el segundo candidato mAb, CHIR-5.9, fue al menos tan eficaz como el rituximab en una dosis de 1/10 que de

rituximab. Ambos anti-CD40 mAb CHIR-12.12 y el rituxan previenen significativamente el desarrollo de tumor en el modelo de tumor Daudi no representado (resistencia al reto de tumor 14/15) (Figura 5).

Cuando los anticuerpos monoclonales anti-CD40 se compararon adicionalmente en un modelo Daudi de de xenoingerto representado, en el que el tratamiento inicia cuando el tumor subcutáneo era palpable, el anti-CD40 mAb CHIR-12.12 en 1 mg/kg originó reducción de tumor significativa ($p=0.003$) con 60% de regresión completa (6/10), mientras que el rituximab en la misma dosis no inhibió significativamente el crecimiento de tumor ni originó regresión completa (0/10). Ver Figura 6.

En resumen, el anti-CD40 mAb CHIR-12.12 inhibe significativamente el crecimiento de tumor en modelos de linfoma experimentales. En la misma dosis y régimen, el mAb CHIR-12.12 muestra mejor actividad anticáncer que lo que lo hizo el Rituxan® (rituximab). Adicionalmente, no se observó signos clínicos de toxicidad en esta dosis y régimen. Estos datos sugieren que el anti-CD40 mAb CHIR-12.12 tienen potente actividad de linfoma antihumano *in vitro* y en modelo de xenoingerto y puede ser clínicamente efectivo para el tratamiento del linfoma.

Ejemplo 16: Farmacocinéticas de CHIR-5.9 y CHIR-12.12

000000

Los farmacocinéticas del anti-CD40 mAb en ratones se estudia después de administración de dosis IP y sencilla IV. El anti-CD40 mAb exhibe alta biodisponibilidad sistémica después de administración IP, y vida media terminal prolongada (>5 días) (datos no mostrados). Este estudio piloto se condujo para ayudar en el diseño de estudios farmacológicos; sin embargo, es muy importante para la actividad de desarrollo de este mAb en razón a que éste mAb completamente humano no reacciona con el CD40 de ratón.

Ejemplo 17: Caracterización de Epítipo para Anticuerpos Monoclonales para CHIR-12.12 y CHIR-5.9

Para determinar la ubicación del epítipo en el CD40 reconocido por anticuerpos monoclonales CHIR-12.12 y CHIR-5.9, el análisis SDS-PAGE y Western blot se ejecutan. Se separa CD40 purificado (0.5 µg) sobre un gel NUPAGE 4-12% bajo condiciones de reducción y no reducción, transferidas a las membranas PVDF, y sondeadas con anticuerpo monoclonales en concentración 10 µg/ml. Las manchas se sondean con fosfatasa alcalina conjugada IgG antihumana y desarrollada utilizando el sustrato estabilizado Western Blue^R para la fosfata alcalina (Promega).

Los resultados indican que el anticuerpo monoclonal anti-CD40 CHIR-12.12 reconoce los epítopos en ambas formas no reducidas y reducida del CD40, con la forma no reducida del CD40 que exhibe mayor intensidad que la forma reducida del CD40 (Tabla

000000

15; manchas no mostradas). El hecho de que el reconocimiento fue positivo para ambas formas de CD40 indica que este anticuerpo interactúa con una parte del epítipo conformacional del cual es una secuencia lineal. El anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 reconoce primeramente la forma no reducida del CD40 que sugiere que este anticuerpo interactúa con un epítipo primeramente conformacional (Tabla 15; manchas no mostradas).

Tabla 15. Identificación de dominio.

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

El mapa de la región antigénica en CD40, el cuarto dominio extracelular se clona y expresa en células de insecto como proteínas de fusión GST. La secreción de los cuatro dominios se asegura con una señal de secreción GP67. El súper nadando de células de insecto se analiza por análisis western blot y SDS-PAGE para identificar el dominio que contiene el epítipo.

El anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 reconoce un epítipo sobre dominio 2 bajo ambas condiciones de reducción y no reducción (Tabla 16; manchas no mostradas). Por el contrario, el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 exhibe un reconocimiento muy débil para el dominio dos (Tabla 16; manchas no mostradas). Ninguno de

000227

estos anticuerpos reconoce los dominios 1, 3, o 4 en este análisis.

Tabla 16. Análisis de dominio 2.

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

Para definir más precisamente el epítipo reconocido por CHIR-12.12, los péptidos se sintetizan del dominio dos extracelular del CD40, que corresponde a la secuencia PCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICT (los residuos 61-104 de la secuencia mostrada en la ID de SEC No.: 10 o ID de SEC No.: 12) las membranas SPOT (Sigma) contienen 35 péptidos 10 mero con 1 aminoácido-1 se genera. Se ejecuta análisis Western blot con mAb CHIR-12.12 y IgG beta-galatoxidasa antihumana como anticuerpo secundario. La mancha se pela y se resondea con mAb CHIR-5.9 para determinar la región reconocida por este anticuerpo.

Los análisis SPOT que se sondean con anticuerpo monoclonal anti-CD40 CHIR-12.12 en 10 µg/ml produjo reacciones positivas con 18 a 22 manchas. La región de secuencia cubierta por estos péptidos se muestra en la Tabla 17.

Tabla 17. Resultados de análisis SPOT sondeado con anticuerpo monoclonal anti-CD40 CHIR-12.12.

000007

Número Spot	Región de secuencia
18	HQHKYCDPNL (residuos 78-87 de la ID de SEC No.: 10 o ID de SEC No.: 12)
19	QHKYCDPNLG (residuos 79-88 de la ID de SEC No.: 10 o ID de SEC No.: 12)
20	HKYCDPNLGL (residuos 80-89 de la ID de SEC No.: 10 o ID de SEC No.: 12)
21	KYCDPNLGLR (residuos 81-90 de la ID de SEC No.: 10 o ID de SEC No.: 12)
22	YCDPNLGLRV (residuos 82-91 de la ID de SEC No.: 10 o ID de SEC No.: 12)

Esos resultados corresponden a un epítopo lineal de: YCDPNL (residuos 82-87 de la secuencia mostrados en la ID de SEC No.: 10 o ID de SEC No.: 12). Este epítopo contiene Y82, D84, y N86, que se han predicho por estar involucrados en la interacción de ligando CD40-CD40.

Los análisis SPOT con mAb CHIR-5.9 muestran un débil reconocimiento de péptidos representados por las manchas 20-22 mostradas en la Tabla 18. Lo que sugiere involucramiento de la región YCDPNLGL (residuos 82-89 de la secuencia mostrada de la ID de SEC No.: 10 o ID de SEC No.: 12) en su unión al CD40. Se debe notar que el mAbs CHIR-12.12 y CHIR-5.9 compiten el uno con el otro para unirse al CD40 en el análisis BIACORE.

Tabla 18. Resultados de análisis SPOT que sondean con anticuerpo monoclonal anti-CD40 CHIR-5.9.

006776

Número Spot	Región de secuencia
20	HKYCDPNLGL (residuos 80-89 de la ID de SEC No.: 10 o ID de SEC No.: 12)
21	KYCDPNLGLR (residuos 81-90 de la ID de SEC No.: 10 o ID de SEC No.: 12)
22	YCDPNLGLRV (residuos 82-91 de la ID de SEC No.: 10 o ID de SEC No.: 12)

Los epítomos lineales identificados por los análisis SPOT están dentro del módulo CD40. La secuencia del módulo CD40 B1 es: HKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTIC (los residuos 80-103 de la ID de SEC No.: 10 o ID de SEC No.: 12).

Dentro de un epítomo lineal identificado para el CHIR-12.12 es C83. Se conoce que este residuo de Cisteína forma un enlace disulfuro con C103. Es probable que el epítomo conformacional del CHIR-12.12 mAb contenga este enlace de disulfuro (C83-C103) y/o aminoácidos envolventes conformacionalmente cercanos al C103.

Ejemplo 18: Número de Moléculas CD20 y CD40 en Células Namalwa y Daudi

El número de moléculas CD20 y CD40 en células Namalwa y Daudi se determina como se resalta en la Figura 7, utilizando concentraciones de anticuerpo de 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 µg/ml. Como se puede ver en la Figura 7, el número promedio de moléculas CD20 (objetivo para rituximab) es mayor en ambas líneas de células Namalwa y Daudi que es el número de moléculas CD40 (objetivo para mAb CHIR-12.12).

00000

Ejemplo 19: ADCC de mAb CHIR-12.12 y Rituximab contra
Células de Linfoma Daudi

El rituximab y el mAb CHIR-12.12 candidato se ensayan *in vitro* para actividad ADCC en concentraciones variables contra líneas de células de linfoma Daudi como células (T) objetivo y células NK purificadas de voluntarios humanos saludables como células (E) efectoras. Se mezclan células NK humanas aisladas frescas con células de linfoma Daudi marcadas con calceína en una proporción E:T de 10. La mezcla de células se incuba durante cuatro horas a 37° C en la presencia de concentraciones establecidas de mAb CHIR-12.12 o rituximab. El nivel de calceína liberado de las células objetivos lisadas en el súper nadante se miden como Unidades Fluorescentes Arbitrarias (AFU). El porcentaje específico de lisis se calcula como: $100 \times (\text{ensayo AFU} - \text{liberación espontánea de AFU}) / (\text{liberación máxima de AFU} - \text{liberación espontánea de AFU})$, en donde la liberación espontánea de AFU es la liberación de calceína mediante las células objetivo en la ausencia de un anticuerpo o células NK, y la liberación máxima AFU es la liberación de calceína por las células objetivo luego de lisis por detergente.

Se observa lisis de célula Daudi dependiente de la concentración de anticuerpo (Figura 8; Tabla 19 adelante). La lisis específica máxima de las células de linfoma objetivo inducidas por anti-CD40 mAb fue mayor comparada con la lisis

inducida por rituximab (63.6% versus 45.9%, n=6; ensayo t emparejado de mAb CHIR-12.12 versus rituximab, P=0.0002). Adicionalmente, el ED50 para el rituximab era de promedio (n=6) 51.6 pM, 13 veces mayor que el ED50 para el anti-CD40 mAb CHIR-12.12 para esta actividad.

Tabla 19. ADCC comparativo de mAb CHIR-12.12 y rituximab contra células de linfoma Daudi.

Célula de donador NK	Muerte máxima (%)		ED50 (pM)	
	mAb CHIR-12.12	Rituximab	mAb CHIR-12.12	Rituximab
1	50.2	34.9	3.2	14.2
2	83.1	68.6	2.2	27.2
3	64.2	36.9	4.1	66.9
4	53.3	39.5	2.4	47.6
5	74.8	56.6	2.8	24.1
6	56.2	38.9	7.9	129.5
Promedio	63.6	45.9	3.8	51.6

Ejemplo 20: el CHIR-12.12 Bloquea las Trayectorias de Señalización y Supervivencia del CD40 mediado por CD40L en Células B Humanas Normales

El ligando CD40 soluble (CD40L) activa las células B e induce varios aspectos de respuestas funcionales, que incluyen el mejoramiento de la proliferación y supervivencia, y activación de NFκB, ERK/MAPK, PI3K/Akt, y trayectorias de señalización p38. Adicionalmente, la estimulación CD40 mediada por CD40L suministra señales de supervivencia mediante reducción de PARP clivado e

inducción de las proteínas anti-apoptóticas, XIAP y Mcl-1, en células B normales. La estimulación CD40 mediada por CD40L también recupera el TRAF2 y TRAF3 para unirse al dominio citoplásmico CD40.

Los siguientes estudios demuestran que el CHIR-12.12 inhibe directamente todos estos efectos de estimulación en células B humanas normales. Por ejemplo, el tratamiento CHIR-12.12 resulta en un clivaje incrementado de caspasa-9, caspasa-3, y PARP así como también reducción de XIAP y Mcl-1 en una forma dependiente de la dosis y del tiempo, restaurando la apoptosis de célula B. El tratamiento con CHIR-12.12 también inhibe la fosforilación de la quinasa I κ B (IKK) α y β (trayectoria NF κ B), ERK, Akt, y p38 en respuesta a la estimulación CD40 mediada por CD40L. Adicionalmente se encuentra que el CHIR-12.12 no acciona estos efectos apoptóticos sin estimulación CD40 mediada por CD40L inicial.

CHIR-12.12 inhibe la supervivencia mediada por ligando CD40 al inducir clivaje de PARP.

En estos experimentos, 0.6×10^6 células B humanas normales de donantes saludables (porcentaje de pureza entre 85-95%) se estimulan con 1 μ g/ml de sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). El CHIR-12.12 (10 μ g/ml) y el IgG de control se agregaron luego. Se recolectan células en 0,20 minutos, 2 horas, 6 horas, 18 horas, y 26 horas. Se detectan

000717

controles de caspasa clivada 9, caspasa clivada 3, PARP clivado, y β -actina en lisatos de células mediante Western blot.

En resumen, se observa que la estimulación CD40 mediada por CD40L suministra señales de supervivencia ya que esto no resulta en un incremento de caspasa clivada 9, caspasa clivada 3, o PARP clivado durante el tiempo, indicando que las células no experimentaron apoptosis. Sin embargo, el tratamiento con CHIR-12.12 resulta en un incremento de estos productos de clivaje, lo que indica que el tratamiento con CHIR-12.12 abroga los efectos de la unión CD40L en señalización de supervivencia en células B normales estimuladas con sCD40L, restaurando la apoptosis de células B (datos no mostrados).

CHIR-12.12 inhibe la expresión de "supervivencia" de proteínas antiapoptóticas.

En estos experimentos, 0.6×10^6 células B humanas normales de donantes saludables (porcentaje de pureza entre 85-95%) se estimulan con 1 $\mu\text{g/ml}$ de sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). Se agregan CHIR-12.12 (10 $\mu\text{g/ml}$) e IgG de control. Las células se recolectan en 0,20 minutos, 2 horas, 6 horas, 18 horas, y 26 horas. Se detectan controles Mcl-1, XIAP, CD40, y β -actina en lisatos de células mediante Western blot.

En resumen, la estimulación de sCD40L resulta en la expresión sostenida de Mcl-1 y XIAP durante el tiempo. Sin

000~1?

embargo, el tratamiento de células estimuladas con sCD40L con CHIR-12.12 resulta en una reducción en la expresión de estas proteínas durante el tiempo (datos no mostrados). En razón a que el Mcl-1 y XIAP son señales de "supervivencia" capaces de bloquear la trayectoria apoptótica, estos resultados demuestran que el tratamiento de CHIR-12.12 remueve el bloqueo contra la apoptosis en las células B normales estimuladas con sCD40L.

El tratamiento CHIR-12.12 inhibe la fosforilación del IKK α (Ser 180) y IKK β (ser 181) en células B normales.

En estos experimentos, 1.0×10^6 células B humanas normales de donantes saludables (porcentaje de pureza entre 85-95%) se estimulan con 1 $\mu\text{g/ml}$ de sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). Se agrega CHIR-12.12 (10 $\mu\text{g/ml}$) e IgG de control. Las células se recolectan en 0 y 20 minutos. Se detectan IKK α fosforilado (Ser 180) y IKK β (Ser 181) y controles IKK β en lisatos de células mediante Western blot.

En resumen, la estimulación por sCD40L resulta en la fosforilación de IKK α (Ser 180) y IKK β (ser 181) durante el tiempo; sin embargo, el tratamiento CHIR-12.12 abroga esta respuesta para estimulación sCD40L en células B normales (datos no mostrados).

El tratamiento CHIR-12.12 inhibe la supervivencia mediada por el ligando CD40 en una forma dependiente de dosis.

000004

En estos experimentos, 0.6×10^6 células B humanas normales de donantes saludables (porcentaje de pureza entre 85-95%) se estimulan con 1 $\mu\text{g/ml}$ de sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). Se agrega CHIR-12.12 (0.01, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 $\mu\text{g/ml}$) y IgG de control. Las células se recolectan en 24 horas. El PARP clivado, y los controles β -actina se detectan en lisatos de células mediante Western blot.

En resumen, el tratamiento con CHIR-12.12 resulta en incremento de clivaje PARP en células estimuladas con sCD40L en una forma dependiente de la dosis y por lo tanto abroga la supervivencia de la trayectoria de señalización en células B normales estimuladas con sCD40L (datos no mostrados).

El CHIR-12.12 inhibe la expresión de "supervivencia" de proteínas antiapoptóticas en una forma dependiente de dosis.

En estos experimentos, 0.6×10^6 células B humanas normales de donantes saludables (porcentaje de pureza entre 85-95%) se estimulan con 1 $\mu\text{g/ml}$ de sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). El CHIR-12.12 (0.5, 2, y 10 $\mu\text{g/ml}$) y IgG de control se agregan entonces. Las células se recolectan en 22 horas. Se detecta Mcl-1, XIAP, PARP clivado, y controles β -actina en lisatos de células mediante Western blot.

En resumen, el tratamiento con CHIR-12.12 reduce la expresión Mcl-1 y XIAP e incrementa la expresión PARP clivada en células sCD40L estimuladas en una forma dependiente de la dosis, y abroga así estos bloqueos a la trayectoria apoptótica en células B normales estimuladas sCD40L (datos no mostrados).

CHIR-12.12 no afecta la expresión de proteínas antiapoptóticas, PARP clivado, y XIAP, en la ausencia de señalización CD40 soluble.

En estos experimentos, 1.0×10^6 células B humanas normales de donantes saludables (porcentaje de pureza entre 85-95%) se tratan con CHIR-12.12 (10 µg/ml) y IgG de control solo (es decir, las células no se preestimularon con sCD40L antes de agregar anticuerpos). Se recolectan células en 0, 4, 14, y 16 horas. El XIAP, el PARP clivado y los controles de β -actina se detectan en lisatos de células mediante Western blot.

En resumen, los resultados muestran que sin la estimulación CD40L, las células expresaron concentraciones incrementadas de PARP clivado, mientras que la expresión de XIAP mantenida constante en las células de control tratadas IgG y células CHIR-12.12 (datos no mostrados). Estos datos indican que el CHIR-12.12 no acciona la apoptosis en células B humanas normales sin estimulación CD40L.

000216

El CHIR-12.12 inhibe la fosforilación del IKK α (Ser 180) y IKK β (ser 181), Akt, ERK, y p38 en células B normales.

En estos experimentos, 1.0×10^6 células B humanas normales de donantes saludables (porcentaje de pureza entre 85-95%) se privaron de suero en 1% de medio que contiene FBS y se estimulan con 1 μ g/ml de sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). Los cultivos se tratan con CHIR-12.12 (10 μ g/ml) e IgG de control. Las células se recolectan en 0 y 20 minutos. El fosfo-IKK α , fosfo-IKK β , IKK β total, fosfo-ERK, ERK total, fosfo-Akt, Akt total, fosfo-p38, p38 total se detectan en lisatos de células mediante Western blot.

En resumen, la estimulación sCD40L resulta en incrementos en la fosforilación IKK α/β , la fosforilación ERK, la fosforilación Akt, y la fosforilación p38, conducen así a la supervivencia o proliferación de las células. El tratamiento de las CHIR-12.12 abroga los efectos de la estimulación sCD40L de estas trayectorias de señalización en células B normales (datos no mostrados).

El CHIR-12.12 inhibe las trayectorias de señalización múltiples tales como P13K y MEK/ERK en la cascada de señalización CD40.

000~1"

En estos experimentos, 1.0×10^6 células B humanas normales de donantes saludables (porcentaje de pureza entre 85-95%) se

privan de suero en 1% de medio que contiene FBS y se estimulan con 1 µg/ml de sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). Los cultivos también se tratan con CHIR-12.12 (1 y 10 µg/ml), Wortmanin, (un inhibidor PI3K/Akt; 1 y 10 µM), LY 294002 (un inhibidor PI3K/Akt; 10 y 30 µM), y PD 98095 (un inhibidor MEK; 10 y 30 µg/ml). Las células se recolectan en 0 y 20 minutos. Fosfo-ERK, fosfo-Akt, Akt total, fosfo- IKKα/β, y el total se detectan en lisatos de células mediante Western blot.

En resumen, los resultados muestran que el CHIR-12.12 abroga la fosforilación de todas estas moléculas de transducción de señal, mientras que los inhibidores de transducción de señal solo mostraron abrogación específica de señalización, lo que indica que CHIR-12.12 inhibe probablemente corriente arriba de estas moléculas de transducción de señal mediadas por estimulación CD40L (datos no mostrados).

El CHIR-12.12 inhibe las uniones de moléculas de señalización TRAF2 y TRAF3 al dominio citoplásmico de CD40 en células B normales.

En estos experimentos, 4.0×10^6 células B humanas normales de donantes saludables (porcentaje de pureza entre 85-95%) se privan de suero durante cuatro horas en 1% de medio que contiene FBS y se estimulan con 1 µg/ml de sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK), durante 20 minutos. Las células se recolectan en 0 y 20 minutos. El CD40 se inmunoprecipita

000000

utilizando anti-CD40 poligonal (Santa Cruz Biotechnology, CA), y se sondea en un Western blot con anti-TRAF2 mAb (Santa Cruz Biotechnology, CA), anti-TRAF3 mAb (Santa Cruz Biotechnology, CA), y anti-CD40 mAb (Santa Cruz Biotechnology, CA).

En resumen, los resultados muestran que el TRAF2 y el TRAF3 se coprecipitan con el CD40 después de estimulación sCD40L. En contraste, el tratamiento con CHIR-12.12 aboga la formación del complejo de señalización CD40-TRAF2/3 en células B normales estimuladas con sCD40L. No hubo cambios en la expresión CD40 (datos no mostrados).

Sin estar ligado por la teoría, los resultados de estos experimentos, y los resultados en los ejemplos resaltados anteriormente, indican que el anticuerpo CHIR-12.12 es un anticuerpo monoclonal anti-CD40 antagonista de acción dual que tiene una única combinación de atributos. Este anticuerpo monoclonal completamente humano bloquea las trayectorias de señalización CD40 mediada por CD40L para la supervivencia y proliferación de las células B; este antagonismo conduce a la muerte de la célula. El CHIR-12.12 también media el reconocimiento y la unión por células efectoras, que inician la citotoxicidad de la célula dependiente de anticuerpo (ADCC). Una vez se une el CHIR-12.12 a las células efectoras, las encimas citolíticas se liberan, conduciendo a la apoptosis de célula B y a la lisis. El CHIR-12.12 es un anticuerpo anti-tumor más potente

de lo que es el rituximab cuando se compara en modelos de tumor preclínicos.

Ejemplo 21: Actividad Agonista y Antagonista Contra Células de Cáncer Primario de Pacientes NHL, CLL y NM

En colaboración con investigadores clínicos, los candidatos mAbs se ensayan para una variedad de actividades (listadas adelante) contra células de cáncer primario de pacientes de mieloma múltiple, NHL y CLL.

- efecto agonista en ensayo de proliferación (8 pacientes NHL, 8 pacientes CLL y 8 pacientes MM)
- Efecto antagonista en ensayo de proliferación (8 pacientes NHL, 8 pacientes CLL y 8 pacientes MM)
- Efecto apoptótico por ensayo de Anexina V (3-4 pacientes NHL, 4 pacientes CLL y 4 pacientes MM)
- Reversar señal de supervivencia mediante ensayo de Anexina V (3 pacientes NHL, 3 pacientes CLL y 3 pacientes MM)
- Complemento de citotoxicidad dependiente del complemento (4 pacientes NHL, 4 pacientes CLL y 4 pacientes MM)
- Citotoxicidad dependiente del anticuerpo (6 pacientes NHL, 6 pacientes CLL y 6 pacientes MM)

Ejemplo 22: Identificación de Especies Animales Importantes para Estudios de Toxicidad

000000

En razón a que estos dos anticuerpos candidato no reaccionan con roedores CD40, se debe identificar otras especies para ensayar efectos toxicológicos.

La capacidad de los dos anticuerpos anti-CD40 candidatos para reaccionar con animales CD40 se ensaya mediante ensayos citométricos de flujo. La rata, conejo, perro, monos cinomólogos, y monos titís se ensayan para este estudio.

Los anticuerpos candidatos muestran actividad antagonista luego de la unión al CD40 en células B humanas. Para identificar una especie animal que tiene respuesta similar para los anticuerpos candidatos, los linfocitos de las especies que muestran unión a los anticuerpos candidatos se prueban en ensayos de proliferación para actividad antagonista. Los linfocitos de las especies seleccionadas para unión antagonística de anticuerpos candidato se ensayan adicionalmente por su capacidad para servir como células efectoras para matar líneas de células de linfoma que expresan CD40 a través del mecanismo de ADCC. Finalmente, las especies animales seleccionadas se ensayan en un estudio IHC para el patrón de unión de tejido de anticuerpo candidato. Las especies animales que responden a los anticuerpos candidato en estos ensayos en una forma similar a aquella observada para células humanas se escogen para estudios toxicológicos.

000-00

Estudios iniciales indican que el anti-CD40 mAbs candidato reacciona con monos cinómologos CD40.

Ejemplo 23: Perfil de Tratamiento de Tumor de CHIR-5.9 y CHIR-12.12

Para determinar el perfil objetivo de tumor relativo de los anticuerpos CHIR-12.12 y CHIR-5.9 mAbs, mAbs candidato marcado fluorescente e isotipo de control se administran en ratones que tienen tumores. Los especímenes de tumor y los órganos normales se cosechan en diferentes puntos de tiempo después de dosificación. La acumulación de anticuerpo marcado en los tumores y órganos normales se analiza.

Ejemplo 24: Mecanismo de Acción de CHIR-5.9 y CHIR-12.12

Para elucidar los mecanismos que median la inhibición de crecimiento de tumor por el CHIR-5.9 y CHIR-12.12 mAbs, se toman en cuenta los siguientes estudios:

Modelo de bloqueo o transgénico de receptor Fc: El ADCC se media por la unión de las células efectoras tales como NK, macrófagos, y monocitos para la porción Fc de anticuerpo a través del receptor Fc. Ratones deficientes en la activación de receptores Fc así como también anticuerpos contruidos por ingeniería para interrumpir la unión Fc a aquellos receptores bloquearan la inhibición de crecimiento de tumor mediada por

ADCC. La pérdida o inhibición de tumor significativamente reducida en este modelo sugerirá que la inhibición de crecimiento de tumor mediante estos dos mAbs candidatos se media principalmente por el mecanismo ADCC.

Ejemplo 25: Formulación Farmacéutica Líquida para Anticuerpos Anti-CD40 Antagonistas

El objetivo de este estudio es investigar los efectos de la solución de pH en la estabilidad del anticuerpo anti-CD40 antagonista CHIR-12.12 por métodos biofísicos y bioquímicos con el fin de seleccionar el medio ambiente óptimo de solución para este anticuerpo. Los resultados de la calorimetría de exploración diferencial muestran que la conformación de la estabilidad del CHIR-12.12 es óptima en formulaciones que tienen pH 5.5-6.5. Basado en una combinación de análisis SDS-PAGE, HPLC de exclusión de tamaño (SEC-HPLC), y HPLC de intercambio de Cation (CEX-HPLC), la estabilidad físico química del CHIR-12.12 es óptima en aproximadamente pH 5.0-5.5. En vista de estos resultados, una formulación farmacéutica líquida recomendada que comprende este anticuerpo es una formulación que comprende CHIR-12.12 en aproximadamente 20 mg/ml formulado en aproximadamente 10 mM de succinato de sodio, aproximadamente 150 mM de cloruro de sodio, y tiene un pH de aproximadamente 5.5.

Materiales y Métodos

00023

El anticuerpo CHIR-12.12 utiliza en estudios de formulación es un anticuerpo monoclonal humano producido por los procesos de cultivo de células CHO. Este MAb tiene un peso molecular de 150 kDa y consiste de dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas ligadas juntas mediante bandas de disulfuro. Esto se objetiva contra el receptor de superficie celular CD40 en las células que expresan CD40, que incluyen células B malignas y normales, para tratamientote varios cánceres y enfermedades autoinmunes/inflamatorias.

Las sustancia de droga anti-CD40 utilizada para este estudio era un lote de masa anti-CD40 (CHIR-12.12) purificado derivado de CHO. La composición de la sustancia de droga era de 9.7 mg/ml de anticuerpo CHIR-12.12 in 10 mM de citrato de sodio, 150 mM de cloruro de sodio, en pH 6.5.La muestra de control en el estudio fue la sustancia de droga recibida, seguida por congelamiento a $\leq -60^{\circ}$ C descongelamiento a TA y ensayo junto con muestras de estabilidad en puntos de tiempo predeterminado. Las muestras de estabilidad se preparan mediante diálisis de la sustancia de droga contra soluciones de diferentes pH y la concentración CHIR-12.12 en cada muestra se determina mediante UV 280 como se presenta en la Tabla 20.

000004

Tabla 20. Formulación CHIR-12.12.

Composición Amortiguadora	pH	Concentración de CHIR-12.12
Citrato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150	4.5	9.0

mM		
Succinato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM	5.0	9.3
Succinato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM	5.5	9.3
Citrato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM	6.0	9.7
Citrato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM	6.5	9.4
Fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM	7.0	9.4
Fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM	7.5	9.5
Glicina 10 mM, cloruro de sodio 150 mM	9.0	9.5

Estabilidad físico química del anticuerpo CHIR-12.12 en las varias formulaciones que se ensayan utilizando los siguientes protocolos.

Calorimetría de Exploración Diferencial (DSC)

Estabilidad conformacional de muestras de diferente formulación se monitorean utilizando un MicroCal VP-DSC luego de calentar a 15° C a 90 ° C en 1° C/min.

SDS-PAGE

Se estima la fragmentación y agregación utilizando 4-20% de gel Tris-Glicino bajo condiciones de reducción y no reducción. Se detecta proteína mediante tinte azul Coomassie.

000125

Cromatografía de Exclusión de Tamaño (SEC-HPLC)

También se mide la fragmentación y agregación de la proteína mediante un HPLC Water Alliance con una columna Tosohass TSK-GEL 3000SWXL, 100 mM de fosfato de sodio, pH 7.0 como fase móvil en un índice de flujo de 0.7 ml/min.

Cromatografía de Intercambio de Cation (CEX-HPLC)

Se mide el cambio de carga relacionada con la degradación utilizando el sistema Water 600s HPLC con una columna Dionex Propac WCX-10, 50 mM HEPES, pH 7.3 como fase móvil A y 50 mM HEPES que contiene 500 mM de NaCl, pH 7.3 como la fase móvil B en una proporción de 0.5° C/min.

Resultados y Discusión

Estudio de estabilidad conformacional.

El desdoblamiento térmico del CHIR-12.12 revela al menos dos transiciones térmicas, probablemente representando el desdoblamiento de fusión de los dominios Fab y Fc, respectivamente, a mayores temperaturas, la proteína presumiblemente agregada, resulta en pérdida de señal DSC. Para los propósitos de selección de formulación, la temperatura de transmisión térmica más baja se define como la temperatura de fusión, T_m , en este estudio. La Figura 13 muestra la temperatura de fusión térmica como una función de formulaciones pHs. Las

formulaciones en pH 5.5-6.5 suministran un anti-CD40 con mayor estabilidad conformacional según se demuestra por las temperaturas de fusión térmica mayores.

Análisis SDS-PAGE.

Las muestras de formulación CHIR-12.12 en pH 4.5-9.0 se incuban a 40° C durante dos meses y se someten a análisis SDS-PAGE (datos no mostrados). Bajo condiciones de no reducción, las especies con peso molecular (PM) de 23 kDa y 27 kDa se observan en formulaciones sobre el pH 5.5, y especies con PM de 51 kDa se observan en todas las formulaciones, pero aparecen menos en pH 5.0-5.5. Una especie con PM de 100 kDa se puede ver en pH 7.5 y pH 9.0.

Bajo condiciones de reducción, se reduce el CHIR-12.12 en cadenas pesadas libres y cadenas livianas con PM de 50 kDa y 24 kDa, respectivamente. Las especies de 100 kDa parecen no completamente reducibles y se incrementan al aumentar el pH de la solución, sugiriendo que puede ocurrir asociación covalente de no disulfuro en las moléculas. En razón a que existen otras especies con identidades desconocidas en el SDS-PAGE, la comparación de estabilidad para cada formulación se basa en la pureza restante del CHIR-12.12. Formulaciones en pH 5.0-6.0 suministran un ambiente más estable para el CHIR-12.12. Se detectan pocos agregados para el SDS-PAGE (datos no mostrados).

000-000

Análisis SEC-HPLC.

El análisis SEC-HPLC detecta el CHIR-12.12 intacto como la especie de pico principal, una aglomeración de especies como especies de pico frontal separadas de las especies de pico principal, unas especies de fragmento grande como un pico de hombro en la parte trasera de las especies de pico principal, y especies de fragmento pequeño se detectan en especies de pico post-principal. Después es incubación a 5° C y 25° C durante 3 meses, cantidades insignificantes de fragmentos de proteína y aglomerados (<1.0%) se detectan en las anteriores formulaciones y las especies de pico principal CHIR-12.12 mantienen más del 99% de pureza (datos no mostrados). Sin embargo, los fragmentos de proteína desarrollados gradualmente luego de almacenamiento a 40° C y más fragmentos formados en pH 4.5 y pH 6.5-9.0, según se muestra en la Tabla 21. Después de incubar la formulación CHIR-12.12 a 40° C durante 3 meses, aproximadamente 2-3% de aglomerados se detectan en pH 7.5 y pH 9.0, mientras que menos de 1% de aglomerados se detecta en otras formulaciones de pH (datos no mostrados). Los resultados del SEC-HPLC indican que el CHIR-12.12 es más estable en aproximadamente pH 5.0-6.0.

Tabla 21: Resultados del SEC-HPLC de muestras de estabilidad de CHIR-12.12 bajo condiciones de almacenamiento en tiempo real y aceleradas.

. 000228

Ejemplo	% de pico principal				% de Fragmento			
	t=0	40°C 1 m	40°C 2 m	40°C 3 m	t=0	40°C 1 m	40°C 2 m	40°C 3 m
Control	99.4	99.2	99.9	99.5	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
pH 4.5	99.4	93.2	86.0	81.3	<1.0	6.4	13.2	18.1
pH 5.0	99.8	98.7	91.3	89.2	<1.0	<1.0	7.8	10.2
pH 5.5	99.8	98.9	91.4	90.6	<1.0	<1.0	7.6	8.8
pH 6.0	99.6	97.7	90.4	87.3	<1.0	1.9	8.2	11.7
pH 6.5	99.3	93.4	89.0	86.9	<1.0	5.6	9.9	12.4
pH 7.0	99.2	93.9	87.4	85.1	<1.0	5.5	11.1	13.5
pH 7.5	99.1	92.8	84.4	81.9	<1.0	6.4	12.9	16.2
pH 9.0	99.3	82.4	61.6	50.6	<1.0	15.4	36.2	47.6

Análisis CEX-HPLC.

El análisis CEX-HPLC detecta el CHIR-12.12 impacto como las especies de pico principal, variantes ácidas eluidas antes que las especies de pico principal, y las variantes de adición de lisina C-terminal elúan las especies de pico post-principal. La Tabla 22 muestra la dependencia de los porcentajes de las especies CHIR-12.12 de pico principal restante y las variantes ácidas en el pH de la solución. Las muestras de control ya contienen un alto grado de especies ácidas (~33%), probablemente debido a la fermentación temprana de la etapa y los procesos de purificación. La susceptibilidad del CHIR-12.12 a soluciones de pH mayores de alcanza mediante dos hechos: Primero, la muestra de formulación inicial en pH 9.0 (t=0) ya genera 12% más de especies ácidas que el control. El porcentaje de especies ácidas se incrementa brillantemente con el pH incrementado. La degradación relacionada con el cambio de carga se debe probablemente a la desamidación. Los datos anteriores

indican que este tipo de degradación de CHIR-12.12 se minimiza en aproximadamente pH 5.0-5.5.

Tabla 22: Porcentaje de área de pico por CEX-HPLC para CHIR-12.12 en formulaciones de pH diferentes bajo condiciones de almacenamiento acelerado y en tiempo real.

Ejemplo	% de pico principal					% variantes ácidas				
	t=0	5°C 3m	25°C 3 m	40°C 1 m	40°C 2 m	t=0	5°C 3m	25°C 3 m	40°C 1 m	40°C 2 m
Control	49.2	49.8	49.8	49.2	50.3	32.0	33.7	33.7	32.0	33.6
pH 4.5	48.5	49.7	43.7	39.7	30.0	32.5	32.6	38.0	44.2	56.4
pH 5.0	49.6	49.8	48.3	40.6	31.4	32.7	31.8	35.0	44.3	57.1
pH 5.5	50.7	50.3	48.1	40.0	30.2	32.6	31.8	37.8	48.9	63.3
pH 6.0	50.2	49.9	47.9	37.4	23.9	33.1	33.6	38.5	54.9	72.7
pH 6.5	49.4	49.9	42.3	29.7	14.6	33.3	33.6	47.7	65.2	84.6
pH 7.0	49.7	49.9	21.9	-	-	34.4	36.4	64.4	-	-
pH 7.5	49.3	48.3	12.7	-	-	35.5	40.1	79.2	-	-
pH 9.0	41.3	31.8	-	-	-	44.7	59.9	-	-	-

Conclusión

El pH tiene un efecto significativo sobre la estabilidad conformacional y físico química del CHIR-12.12. La degradación relacionada con el cambio de carga se determina por ser la trayectoria de degradación principal para el CHIR-12.12, que se minimiza en pH 5.0-5.5. Basados en datos de estabilidad generales, una formulación farmacéutica líquida recomendada que comprende este anticuerpo es una formulación que comprende CHIR-12.12 en aproximadamente 20 mg/ml formulado en aproximadamente 10 mM de succinato de sodio, aproximadamente 150 mM de cloruro de sodio y que tiene un pH de aproximadamente 5.5.

Ejemplo 26: Estudios clínicos con CHIR-5.9 y CHIR-12.12

Objetivos Clínicos

El objetivo general es proporcionar una terapia efectiva para tumores de células B al tratarlos con un IgG1 anti-CD40. Estos tumores incluyen linfomas de célula B, Linfoma Linfocítico Crónico (CLL), Leucemia Linfoblástica Aguda (ALL), Mieloma Múltiple (MM), Macroglobulinemia de Waldenstrom, y enfermedad Sistémica de Castleman. La señal para estas enfermedades se determina en la fase II aunque alguna medición de la actividad se pueda obtener en la fase I. Inicialmente el agente se estudia como un agente sencillo, pero se combinará con otros agentes, quimioterapias, y otros anticuerpos, según proceda al desarrollo.

Fase I

- Evaluación de seguridad y progresión de dosis de farmacocinéticas en sujetos con malignidades de célula B.
- Escoge dosis basado en la seguridad, tolerabilidad y cambio en los marcadores de suero de CD40. En general se busca un MTD pero otras indicaciones de eficacia (eliminación de células B CD40+, etc.) se pueden adecuar para hallar la dosis.
- Consideración de más de una dosis especialmente para diferentes indicaciones, por ejemplo, la dosis CLL puede ser

000031

diferente de la NHL. Así, hallar algunas dosis puede ser necesario en la fase II.

- Los pacientes se dosifican semanalmente con muestras farmacocinéticas en tiempo real (Pk). Inicialmente un ciclo de cuatro semanas es la dosificación máxima permitida. El Pk puede ser altamente variable en el estudio de la enfermedad, densidad de CD40 etc.

- Este ensayo se abre a los sujetos con linfoma de célula B, CLL y potencialmente otras malignidades de célula B.

- La decisión para discontinuar o continuar los estudios se basa en la seguridad, dosis, y evidencia preliminar de actividad anti-tumor.

- Actividad de las drogas según se determina por el índice de respuesta se establece en la Fase II.

- Identifica la dosis para la Fase II.

Fase II

Se iniciaran varios ensayos en los tipos de tumor mencionados anteriormente con concentración en el linfoma de célula B, CLL, y Mieloma Múltiple (MM). Se pueden requerir ensayos separados en bajo grado y grado intermedio/alto NHL según el CD40 pueda tener una función diferente dependiendo del grado de linfoma. En enfermedades de bajo grado el CD40 actúa más como un factor de supervivencia, evitando la apoptosis. En enfermedades de grado más alto, la interrupción de la señalización CD40 puede conducir a la muerte celular. Más de una

000232

dosis, y más de un calendario se pueden ensayar en una configuración de fase II aleatorizada.

En cada enfermedad, una población objetivo que tiene un estándar actual fallido de cuidados:

- CLL: Pacientes quienes son resistentes al Campath® y quimioterapia.
- Bajo grado NHL: Fallas de Rituxan® o CHOP-R.
- NHL intermedio: Fallas CHOP-R.
- Mieloma Múltiple: Fallas de quimioterapia.

✓ Decisión para continuar o discontinuar con el estudio se basa en la prueba del concepto terapéutico en la Fase II.

✓ Determinar si el marcador subrogado se puede utilizar como indicación anterior de eficacia clínica.

✓ Identifica la dosis para la Fase III.

Fase III

La fase III de si la señal se detecta en la fase II, y que las terapias que competen se consideren son las estándar. Si la señal está en la etapa de enfermedad en donde no hay estándar de terapia entonces un brazo sencillo, estudio bien controlado puede servir como un ensayo pivotante. Si existen agentes de

000737

competencia que se consideren estándar, entonces se conducen estudios cabeza a cabeza.

Muchas modificaciones y otras modalidades de esta invención establecidas aquí llegarán a la mente de un experto en la técnica al cual estas invenciones pertenecen tienen el beneficio de las enseñanzas presentadas en las anteriores descripciones y los dibujos asociados. Por lo tanto, se entenderá que las invenciones no se limitan a las modalidades específicas descritas y que modificaciones y otras modalidades se destinan a estar incluidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y la lista de las modalidades descritas aquí. Aunque se emplean términos específicos aquí, ellos se utilizan aquí solo en un sentido descriptivo y genérico y no para propósito de limitación.

Todas las publicaciones y solicitudes de patentes mencionadas en la especificación son indicadoras del nivel de aquellos expertos en la técnica al cual esta invención pertenece. Todas las publicaciones y solicitudes de patentes se incorporan aquí como referencia para el mismo alcance como si cada publicación individual o solicitud de patente se indicara específica e individualmente para ser incorporada como referencia.

Archivo de referencia del agente o solicitante	PP20107.004	Solicitud internacional No.	PCT/US2004/
--	-------------	-----------------------------	-------------

INDICACIONES RELACIONADAS CON MICROORGANISMOS DEPOSITADOS U OTRO MATERIAL BIOLÓGICO

(Regla 13 bis PCT)

A. Las indicaciones hechas adelante se relacionan con los microorganismos depositados u otros material biológico relacionado con la página 18, línea 25	
B. IDENTIFICACIÓN DE DEPÓSITO	Se identifican depósitos adicionales en una hoja adicional ☒
Nombre de la Institución depositaria	
American Type Culture Collection	
Dirección de Institución depositaria (que incluye código postal y país)	
10801 University Blvd.. Manassas, VA 20110-2209 USA	
Fecha de depósito	Septiembre 17 2003
Número de Acceso	PTA-5542
C. INDICACIONES ADICIONALES (dejar en blanco si no aplica)	Esta información se continúa en una hoja adicional ☐
Página 22, línea 20; página 75, línea 11; página 142, línea 9;	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS CUALES SE HACEN INDICACIONES (si los indicadores no son para todos los Estados designados)	
E. PRESENTACIÓN POR SEPARADO DE LAS INDICACIONES (dejar en blanco si no aplica)	
Las indicaciones listadas adelante se presentarán a la Oficina Internacional después (especifique la naturaleza general de las indicaciones por ejemplo, "Número de Acceso de Depósito"	

Solo para uso de la Oficina receptora
☒ Está hoja se recibe con la solicitud internacional
Funcionario autorizado (Firma ilegible)

Solo para uso de la Oficina Internacional
☐ Está hoja se recibe con la Oficina Internacional en:
Funcionario autorizado

000235

Archivo de referencia del agente o solicitante	PP20107.004	Solicitud internacional No.	PCT/US2004/
--	-------------	-----------------------------	-------------

INDICACIONES RELACIONADAS CON MICROORGANISMOS DEPOSITADOS U OTRO MATERIAL BIOLÓGICO

(Regla 13 bis PCT)

A. Las indicaciones hechas adelante se relacionan con los microorganismos depositados u otros material biológico relacionado con la página 18, línea 25	
B. IDENTIFICACIÓN DE DEPÓSITO	Se identifican depósitos adicionales en una hoja adicional ☐
Nombre de la Institución depositaria	
American Type Culture Collection	
Dirección de Institución depositaria (que incluye código postal y país)	
10801 University Blvd.. Manassas, VA 20110-2209 USA	
Fecha de depósito	Septiembre 17 2003
Número de Acceso	PTA-5543
C. INDICACIONES ADICIONALES (dejar en blanco si no aplica)	Esta información se continúa en una hoja adicional ☐
Página 22, línea 20; página 75, línea 11; página 127, línea 15; página 142, línea 10	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS CUALES SE HACEN INDICACIONES (si los indicadores no son para todos los Estados designados)	
E. PRESENTACIÓN POR SEPARADO DE LAS INDICACIONES (dejar en blanco si no aplica)	
Las indicaciones listadas adelante se presentarán a la Oficina Internacional después (especifique la naturaleza general de las indicaciones por ejemplo, "Número de Acceso de Depósito"	

Solo para uso de la Oficina receptora
☒ Está hoja se recibe con la solicitud internacional
Funcionario autorizado (Firma ilegible)

Solo para uso de la Oficina Internacional
☐ Está hoja se recibe con la Oficina Internacional en:
Funcionario autorizado

000230

ATCC

1081 University Boulevard • Manassas, VA 20110-2209 • Teléfono 703-365-2700 • FAX: 703-365-2745

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE
MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DE PROCEDIMIENTOS DE PATENTE

FORMA INTERNACIONAL

RECIBIDO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL EMITIDO CONFORME A LAS REGLAS 7.3
Y LA DECLARACIÓN DE VIABILIDAD EMITIDA CONFORME A LA REGLA 10

A: (Nombre y dirección del Depositante o Abogado)

Chiron Corporation
Attn: Karen Van Note
4560 Horfot Street
Emeryville, CA 94608

Depositado en nombre de: Chiron Corporation

Referencia de Identificación por el Depositante: Designación de Depósito
de Patente

Hibridoma de ratón 131.2F8.5.9: CMCC#12047 PTA-5542
HIBRIDOMA DE RATÓN 153.8E2D10D6.12.12:CMCC#12056 PTA-5543

Los depósitos se acompañan por: una descripción científica una
descripción taxonómica propuesta indicada anteriormente. Los depósitos se
reciben en Septiembre 17, 2003 por esta Autoridad Depositaria Internacional
y se han aceptado.

CONFORME A INSPECCIÓN: X Le informaremos de las solicitudes para las
cepas durante 30 años.

Las cepas estarán disponibles si una oficina de patentes signataria del
Tratado de Budapest certifica unos derechos para recibir, o si una Patente
Estadounidense se publica citando las cepas, y el ATCC se instruye por la
Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos o el depositante para
liberar dichas cepas.

Si los cultivos deben morir o se destruyen durante el término efectivo del
depósito, será su responsabilidad reemplazarlos con cultivos vivos de los
mismos.

Las cepas se mantendrán durante un periodo de al menos 30 años a partir de la
fecha de depósito, o 5 años después de que la mayoría de solicitudes recientes
para una muestra, cualquiera que sea es más grande. Los Estados Unidos y
muchos otros países son signatarios del Tratado de Budapest.

La viabilidad de los cultivos citados anteriormente se ensayan en Septiembre
23, 2003. En esa fecha, los cultivos fueron viables.

Autoridad Depositaria Internacional: American Type Culture Collection,
Manassas, VA 20110-2209 USA.

Firma de la persona que tiene la autoridad para representar al ATCC:

(Aparece firma ilegible)

Fecha Octubre 2, 2003

María Harris, Especialista en Patentes, Depositario de Patentes ATCC

cc: Lisa Alexander

Ref: Registro o Caso No: P20107.001

000-3

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humano que es capaz de unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expresado en la superficie de una célula que expresa el CD40 humano, dicho anticuerpo monoclonal siendo libre de actividad agonista significativa, de tal suerte que cuando dicho anticuerpo monoclonal se une al anticuerpo CD40 expresado sobre la superficie de dicha célula, el crecimiento o diferenciación de dicha célula se inhibe, en donde dicho anticuerpo se encuentra caracterizado porque se selecciona a partir del grupo que consiste de:
- a) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 obtenible a partir de la línea de célula de hibridoma depositada con el ATCC como Depósito de Patente No. PTA-5542 ó el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 obtenible a partir de la línea de célula de hibridoma depositada con el ATCC como Depósito de Patente No. PTA-5543;
- b) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia CD40 humana mostrada en la ID de SEC No.: 10 o la ID de SEC No.: 12;

06-54042 A
Rvs modificadas
MAYO 7, 2012

c) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia CD40 humana mostrada en la ID de SEC No.: 10 o ID de SEC No.: 12; y

d) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 obtenible a partir de la línea de célula de hibridoma depositada con el ATCC como Depósito de Patente No. PTA-5542 ó el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 obtenido a partir de la línea de célula de hibridoma depositada con el ATCC como Depósito de Patente No. PTA-5543 en un ensayo de unión competitivo.

2. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste de:

i. Un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio

variable de cadena ligera que contiene los residuos 44-54, 70-76 y 109-117 de la SEQ ID No. 2;

ii. Un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio

variable de cadena pesada que contienen los residuos 50-54, 69-84 y 114-121 de la SEQ ID No. 4;

iii. Un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene los residuos 50-54, 69-84 y 114-121 de la SEQ ID No. 5;

06-54042 A
Rvs modificadas
MAYO 7, 2012

- iv. Un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena ligera que contiene los residuos 44-54, 70-76 y 109-117 de la SEQ ID No. 6;
 - v. Un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene los residuos 50-54, 69-84 y 114-121 de la SEQ ID No. 7; y
 - vi. Un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene los residuos 50-54, 69-84 y 114-121 de la SEQ ID No. 8;
- ó es un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste de:
- i. Un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena ligera que contiene los residuos 46-52, 70-72 y 111-116 de la SEQ ID No. 2;
 - ii. Un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene los residuos 45-51, 72-74 y 115-120 de la SEQ ID No. 4;
 - iii. Un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene los residuos 45-51, 72-74 y 115-120 de la SEQ ID No. 5;
 - iv. Un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena ligera que contiene los residuos 46-52, 70-72 y 111-116 de la SEQ ID No. 6;
 - v. Un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene los residuos 45-51, 72-74 y 115-120 de la SEQ ID No. 7; y

000747

06-54042 A
Rvs modificadas
MAYO 7, 2012

vi. Un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene los residuos 45-51, 72-74 y 115-120 de la SEQ ID No. 8.

5 3. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste de:

i. Residuos 21-132 de la SEQ ID No. 2;

10 ii. Residuos 21-239 de la SEQ ID No. 2;

iii. SEQ ID No. 2;

iv. Residuos 20-139 de la SEQ ID No. 4;

v. Residuos 20-469 de la SEQ ID No. 4;

vi. SEQ ID No. 4;

15 vii. Residuos 20-469 de la SEQ ID No. 5;

viii. SEQ ID No. 5;

20 4. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de:

i. Residuos 21-132 de la SEQ ID No. 6;

ii. Residuos 21-239 de la SEQ ID No. 6;

iii. SEQ ID No. 6;

25 iv. Residuos 20-144 de la SEQ ID No. 7;

v. Residuos 20-474 de la SEQ ID No. 7;

vi. SEQ ID No. 7;

0000/1

06-54042 A
Rvs modificadas
MAYO 7, 2012

vii. Residuos 20-474 de la SEQ ID No. 8;

viii. SEQ ID No. 8;

- 5 5. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones, caracterizado porque dicho anticuerpo monoclonal se une a dicho antígeno CD40 humano con una afinidad (K_D) de al menos 10^{-6} M.
- 10 6. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque dicho anticuerpo monoclonal se une a dicho antígeno CD40 humano con una afinidad (K_D) de al menos 10^{-8} M.
- 15 7. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho anticuerpo monoclonal es un fragmento enlazante de antígeno de un anticuerpo monoclonal, en donde dicho fragmento conserva la capacidad de unirse específicamente a dicho antígeno CD40 humano
- 20 8. El fragmento enlazante de antígeno de acuerdo con cualquiera de la reivindicación 7, caracterizado porque dicho fragmento se selecciona del grupo que consiste de un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un
- 25 fragmento Fv y un fragmento Fv de cadena sencilla.
9. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado

06-54042 A
Rvs modificadas
MAYO 7, 2012

porque dicho anticuerpo monoclonal es producido en una línea de célula CHO.

- 5 **10.** Una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo monoclonal de cualquier reivindicación precedente.
- 10 **11.** La línea de célula de hibridoma capaz de producir el anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 15 **12.** Un método *in vitro* para inhibir el crecimiento o diferenciación de una célula B humana normal, que comprende poner en contacto dicha célula B con una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 20 **13.** Un método *in vitro* para inhibir la proliferación de células B humanas normales, en donde dicha proliferación se aumenta por la interacción de un ligando CD40 con un antígeno CD40 expresado en la superficie de dicha célula B, dicho método comprende
- 25 poner en contacto dicha célula B con una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-CD40 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

000243

- 5 **14.** Un método in vitro para inhibir crecimiento de células de B de linaje de células B, que comprende poner en contacto dichas células de cáncer con una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-CD40 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 10 **15.** Un método in vitro para inhibir una trayectoria de señalización de CD40 mediada por ligando CD40 en una célula que expresa CD40 humano, en donde dicho método comprende poner en contacto dicha célula con una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-CD40 de acuerdo con cualquiera de las
- 15 reivindicaciones 1 a 9.
- 20 **16.** El método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde dicha célula que expresa CD40 humano es una célula B humana normal o una célula B humana maligna y dicha trayectoria de señalización de CD40 es de supervivencia de célula B.
- 25 **17.** Un método in vitro para identificar un anticuerpo que tiene una actividad antagonista hacia las células que expresan CD40, que comprende desarrollar un ensayo de unión competitivo con un anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

18. Una composición farmacéutica que comprende un
5 anticuerpo monoclonal anti-CD40 de acuerdo con
cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un
portador farmacéuticamente aceptable.

19. La composición farmacéutica de la reivindicación 18,
10 en donde dicha composición es una formulación
farmacéutica líquida que tiene un pH de 5.0 a 7.0, y
dicha formulación comprende un amortiguador a una
concentración de 1mM a 50 mM, en donde dicho
amortiguador es un ácido o una sal del mismo
15 seleccionado del grupo que consiste de ácido
succínico o succinato, ácido cítrico o citrato, ácido
acético o acetato, ácido tartárico o tartrato, ácido
fosfórico o fosfato, ácido glucónico o gloconato,
ácido glutámico o glutamato, ácido aspártico o
20 aspartato, ácido maléico o maleato y ácido málico o
malato.

20. La composición farmacéutica de la reivindicación 19,
en donde dicha formulación comprende cloruro de sodio
25 a una concentración de 50 mM a 300 mM.

21. La composición farmacéutica de la reivindicación 20,
en donde dicho cloruro de sodio está presente es
dicha formulación en una concentración de 150 mM.

22. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en donde dicho amortiguador se selecciona del grupo que consiste de amortiguadores de succinato, citrato, y de fosfato.

23. La composición farmacéutica de la reivindicación 22, en donde dicho amortiguador es succinato de sodio o citrato de sodio en una concentración de desde 5 mM hasta 15 mM.

24. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en donde dicha formulación comprende adicionalmente un tensoactivo en una cantidad de desde 0.001% hasta 1.0% y en donde dicho tensoactivo es polisorbato 80 ó polisorbato 20.

25. La composición farmacéutica de la reivindicación 24, en donde dicho tensoactivo es polisorbato 80 y el cual está presente en dicha formulación en una cantidad de desde 0.001% hasta 0.5%.

nnn-1-

FIGURA 1A

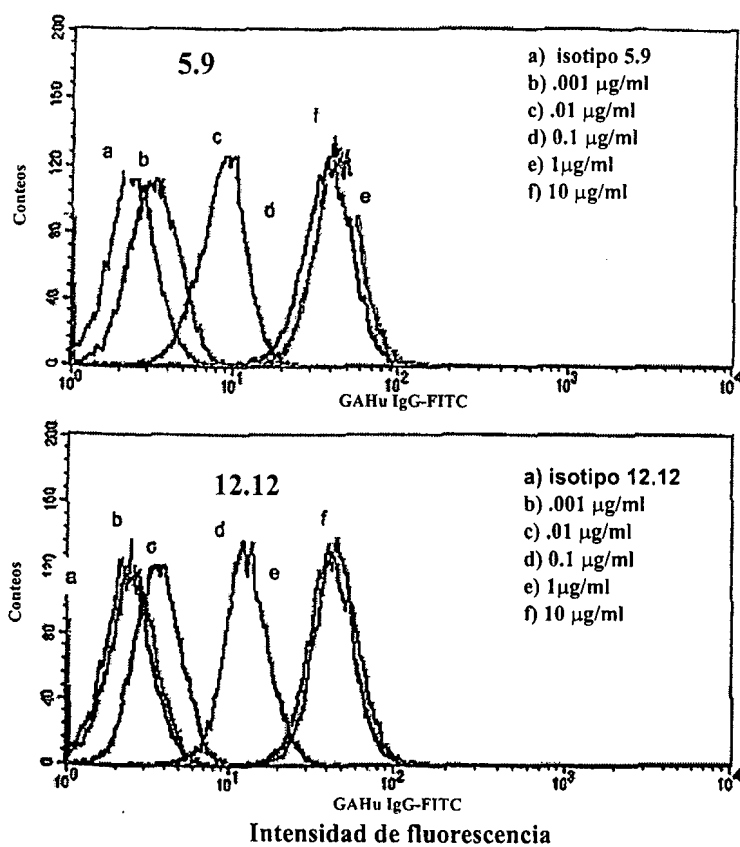


FIGURA 1B

000247

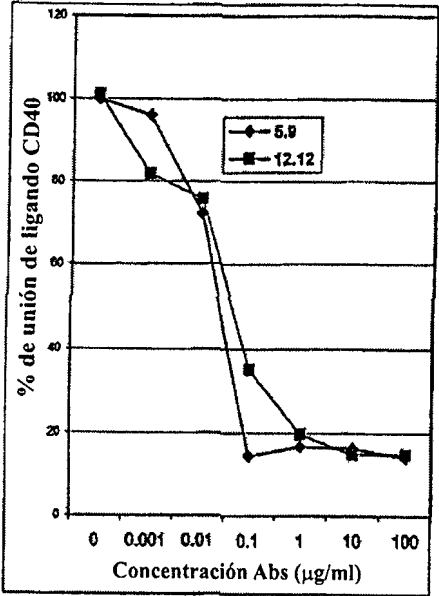


FIGURA 2A

000000

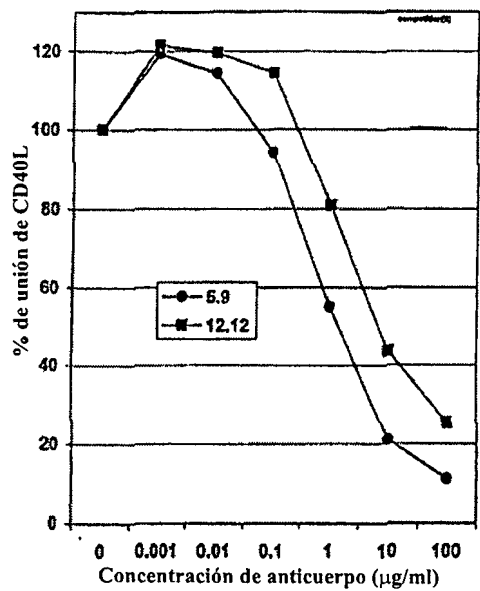


FIGURA 2B

000000

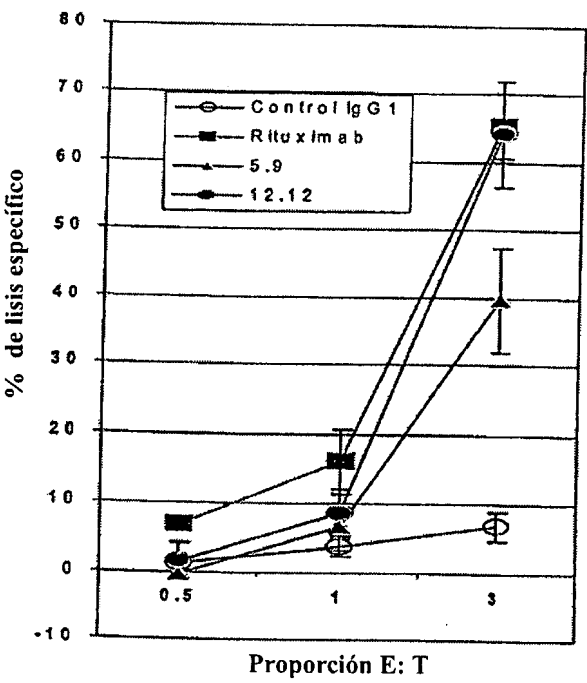


FIGURA 3A

000050

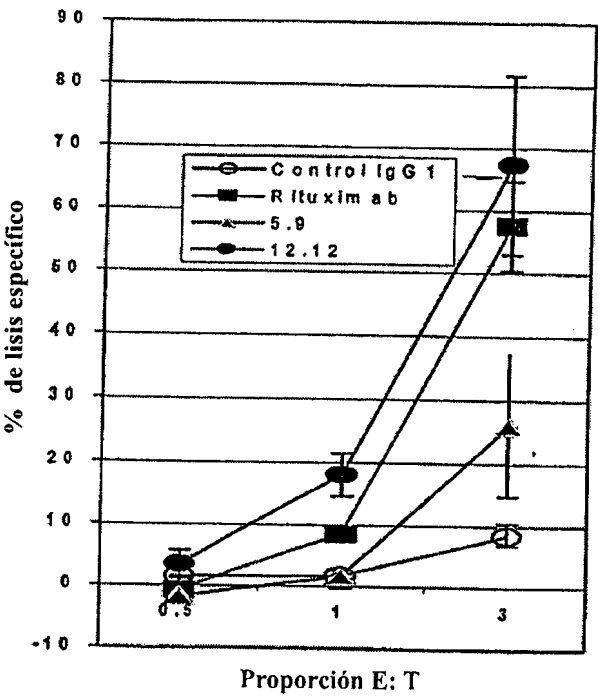


FIGURA 3B

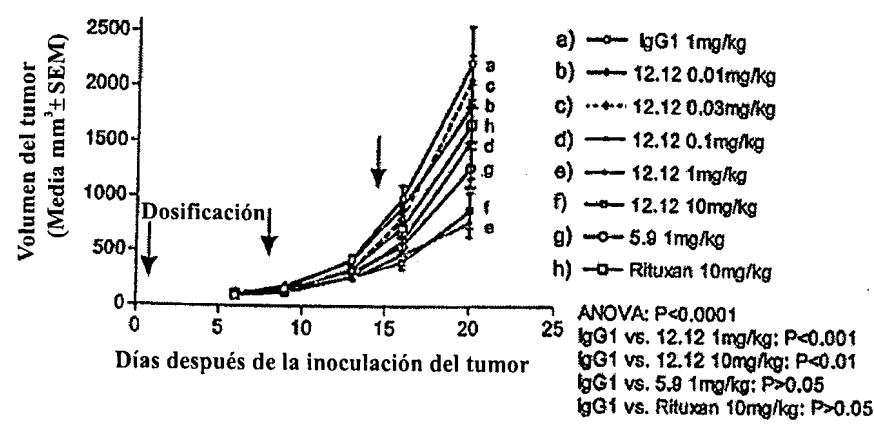


FIGURA 4

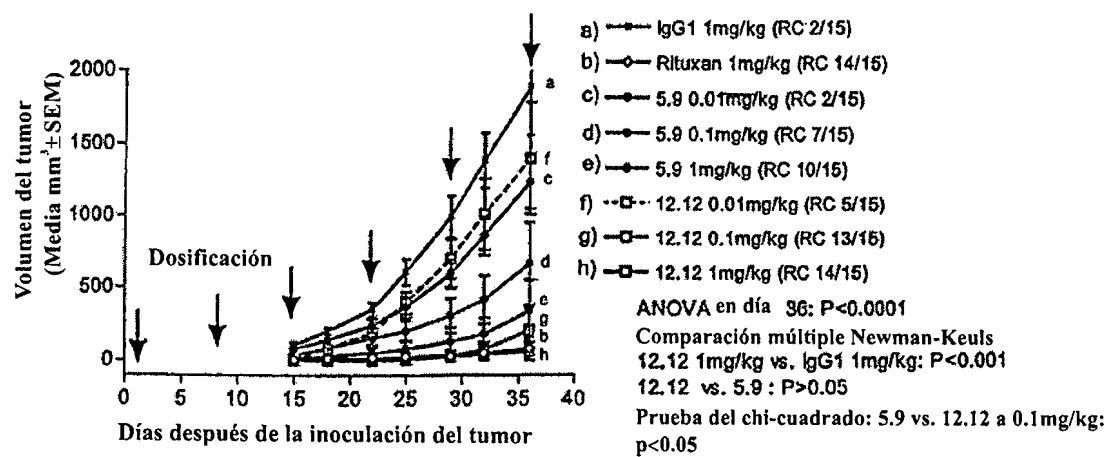


FIGURA 5

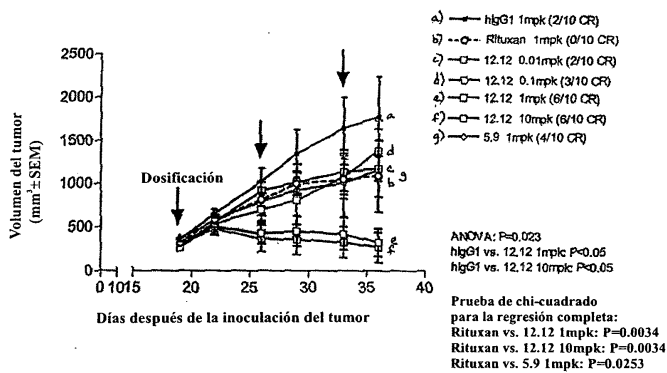


FIGURA 6

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

Métodos:				
1. cosechar y lavar células una vez con PBS w/o Ca++/Mg++ más 0,5% BSA y 0.1% Azida				
2. Bloquear células les con 10% suero en PBS w/o Ca++ / Mg++ mas 0,1/ Azida de sodio en hielo durante 30 minutos.				
3. Teñir las células con anticuerpos conjugados FIAC (12.12-FITC o Rituximab-FITC) en hielo durante 40 minutos. Las células también se tiñen con huIgG1-FITC para control de unión no específico. las concentraciones de anticuerpos fueron de 0.01, 0.1, 10 y 100 Uq por ml.				
4. Determina fluorescencia de medio canal (media Geometria) por citómetro de flujo que utiliza amplificador log. Se agrega un IP para excluir células muertas				
5. Determina fluorescencia de medio canal (media Geometria) de Quantum TM24FITC (3,000 a 5,000MESF), QuantumTM25 FITC (50,000 a 2,000,000 MESF) y Quantum TM26FITC (10,000 a 500,000 MESF) en la misma configuración de instrumento como para análisis de muestra. MESF: Moléculas de fluorocromo solubles equivalentemente				
6. Curva de calibración de construcción al graficar MESF (eje y) vs. la media geométrica (eje x).				
7. El número de moléculas por célula fue determinado usando la siguiente ecuación $y = ax^b$ donde y es igual a MESF y x es igual a fluorescencia de medio canal para la muestras. La fluorescencia de medio canal usado para cada muestra era por medio de Geo en la concentración de la saturación (12.12FITC) o la concentración más alta (rituximabFITC).				
8. Dividir el MESF de la muestra por el numero de moléculas FIAC conjugadas para cada anticuerpo proporción (F:P) para determinar la capacidad de unión de anticuerpos (AEC). ABC para huIgGFITC de muestra respectiva se corrige para obtener el anticuerpo final de capacidad de unión.				
	DAUDII		NAMALWA	
Exp.	CD40	CD20	CD40	CD20
E090403	14403.0	93476.5	3296.4	6200.1
E091003	13214.9	108438.5	3081.5	4788.2
E091103	13702.6	100509.1	3165.7	3988.3
E091203	13278.9	128153.3	3164.9	4618.0
promedio	13,649.9	107,695.6	3,177.1	4,398.7
Stdev	546.7	14915.9	88.8	933.4

FIGURA 7

00055

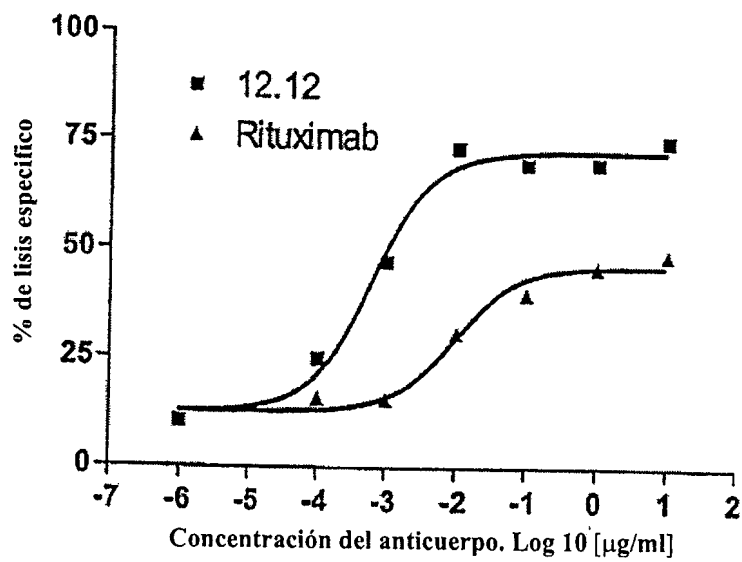


FIGURA 8

000055

FIGURA 9A

Cadena liviana CHIR 12.12:
Líder:
MALPAQLLGLMLWVSGSSG
variable:
DIVMTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQVLISLGSNRASG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQARQTPFTFGPGTKVDIR
Constante:
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIGURA 9B

Cadena pesada CHIR-12.12:
Líder:
MEFGLSWVFLVAILRGVQC
variable:
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSTYGMHWVRQAPGKGLWVAVISYEESNRYHAD
SVKGRFTISRDNISKITLYLQMNSLRTEDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQQTTLTVSS
Constante:
ASTKGPSVFPLAPASKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región constante alternativa:
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

12/16

FIGURA 10A

Secuencia de ADN de cadena liviana de CHIR-12.12:

5'atggcgctccctgctcagctcctggggctgctaagctctgggtctctggtaccagtggggatattgtatgactcagctccactctc
cctgaccgtcaccctggagagccgctccatctcctgaggtccagtcagagcctcctgtatagtaattggatacaactatttgattg
gtacctgcagaagccaggggcagctccacaggtcctgactctcttgggttctaacgggctccgggtccctgacaggtcagtgga
gtggtacaggcacagattttacactgaaatcagcagagtgagggtgaggatgttgggtttattactgcatgcaagctcgacaaact
ccattcactttcggccctgggaccaaagtggatcagacgaactgtggctgcaccatctgtttcatctcccgccatctgatgagcagt
tgaaatctggaactcctctgtgtgtgctgctgaataactctatccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgacctcc
aatcgggttaactccaggagagtgctacagagcaggacagcaaggacagcactacagcctcagcagcaccctgacgtgagcaa
agcagactacgagaacacaaagtctacgctgcgaagtcaccatcagggcctgagctcggccgtcacaaagagcttcaacaggg
gagagtgttag3'

FIGURA 10B

Secuencia de ADN de cadena pesada de CHIR-12.12 (que incluye intrones)

5'atggagtttgggctgagctgggttttctgtgtctatttaagaggtgtccaggtgcaggtgcaggtggtggagctgggggaggcgt
ggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcctcctggattcaccttcagtagctatggcatgcactgggtccgccaggctc
caggcaaggggctggagtggtggcaggtatatacatataggaaagtaataagataccatgcagactccgtgaaggccgattcacca
tctccagagacaattccaagatcacgctgtatctgcaaatgaacagcctcagaactgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagat
gggggtatagcagcactgggctgactactggggccagggaacctgtgtaccgtctcctcagcaagtaaccaaggccatccgt
cttccctcggcgcccgctagcaagagcacctctgggggcacagcgccctgggctgctgtcaaggactacttcccgaaccgg
tgacgtgtcgtggaactcaggcgccctgaaccagggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtccicaggactctactccctcag
cagcgtgtgtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaaagcccagcaaccaagggtgg
acaagagagttggtgagagggccagcacaggaggagggtgtctgtgtggaagccaggctcagcgtcctgctgacgcatcccg
gctatgagtcctccagtcaggcgagcaaggcagggccctgtgtccttccaccggaggcctctgcccggcccaactcatgctcagg
gagagggtcttctgctgttttcccaggtctgtggcagggcacaggttaggtgcccccaaccaggccctgcacacaaaggggcaggt
gctgggtcagacctgccaagagccatctccgggagggacctgcccctgacctaaagcccacccaaaggccaaactctccactccc
tcagctcggacacctctctcctccagattccagtaactcccaatcttctctcgcagagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgc
ccacctgtcccagggttaagccagcccaggcctcgcctccagctcaaggcgggacaggtgcccctagtagtgcctgcacccaggac
aggcccagccgggtgctgacacgtccacctcctctctcctcagcacctgaactcctggggggagcgtcagcttctcttcccccc
aaaaccacaggacacctcatgatctccggacccctgaggcacatgcgtgtgtgtgagcgtgagccacgaagacctgaggtca
agtcaactgtgtacgtgacggcgtgagggtgcataatgccaagacaaagccgcgggagggagcagtagaacagcacgtacgtgt
ggtcagcgtctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctccagccc
ccatcgagaanaacatctcacaagccaaggtgggacccgtgggtgctgagggccacatggacagagggcgtcggccaccc
tctgcccgtgagagtgaccgtgtaccaacctctgtcctacaggggcagcccccaggaaccacaggtgtacacctgccccatcccgg
gaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtgcaaggcttctatcccagcagatcgccgtgaggtgggagagcaa
tgggcagccggagaaactacaagaccacgctcccgtgtgagactccgagcgtccttctctatagcaagctcaccgtggac
aagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcgtgcatgaggtctcgcacaaactacacgcagaagagcctctcc
ctgtctccgggttaataga3'

000258

FIGURA 11A

Cadena liviana CHIR-5.9:
Líder:
MALLAQLLGLMLWVPGSSG
variable:
AIVMTQPPLSSPVTILGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWLQQRPGQPPRLLIYKFFRRLSG
VPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVIYCMQVTQFPHTFGQGTREIX
Constante:
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIGURA 11B

Cadena pesada CHIR-5.9:
Líder:
MGSTAILALLLAVLQGVCA
variable:
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIITPGDSSTRYSP
SPQGGVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGTAAGRDYIIYGMVWGGQTTVTVS
S
Constante:
ASTKGPSVFPLAPASKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFPSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Región constante alternativa:
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFPSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURA 12A

Secuencia de codificación para isoforma
corta CD40 para humano:

```
1 atggttcgtc tgcccttgca gtgcgtcctc tggggctgct tgctgaccgc tgcctatcca
61 gaaccaccca ctgcatgcag agaaaaacag tacctaataa acagtcagtg ctgtttttg
121 tgccagccag gacagaaact ggtgagtgac tgcacagagt tcaactgaaac ggaatgcctt
181 ccttgcggtg aaagcgaatt cctagacacc tggaacagag agacacactg ccaccagcac
241 aaatactgcg accccaacct agggcttcgg gtccagcaga agggcacctc agaaacagac
301 accatctgca cctgtgaaga aggcctggcag tttacagagtg aggcctgtga gagctgtgtc
361 ctgcaccgct catgtcgcgc cggcttggg gtcaagcaga ttgctacagg ggtttctgat
421 accatctgcg agccctgccc agtcggcttc ttctccaatg tttcatctgc ttctgaaaaa
481 tgcaccctt ggacaaggtc cccaggatcg gctgagagcc ctggtgtgta tccccatcat
541 cttcgggac ctgtttgcca tctcttggg gctggtcttt atcaaaaagg tggccaagaa
601 gccaaccaat aa
```

FIGURA 12B

Isoforma corta codificada CD40 para humano:

```
1 mvrplqcvl wgclltavhp epptacrekq ylinsqccsl cpggqklvsd cteftetecl
61 pcgeseftdt wnrethchqh kyedpnlglr vqqkgtsetd tictceegwh ctseacescv
121 lhrscspgfg vkqiatgvsd ticepcpvgf fsnvssafek chpwtrspgs aespggdphh
181 lrdpvchplg aglyqkkgqe anq
```

000260

FIGURA 12C

Secuencia de codificación para isoforma larga
Cd40 para humanos:

```

1 atgggttcgtc tgcctctgca gtgcgtcctc tggggctgct tgcagaccgc tgcctatcca
61 gaaccaccca ctgcatgcag agaaaaacag tacctaafaa acagtcagtg ctgttctttg
121 tggcagccag gacagaaact ggtgagtgac tgcacagagt tcactgaaac ggaatgcctt
181 ccttgcggtg aaagcgaatt cctagacacc tggaaacagag agacacactg ccaccagcac
241 aaatactgag accccaacct agggcttcgg gtccagcaga agggcacctc agaaacagac
301 accatctgca cctgtgaaga aggcctggcac tgtacgagtg aggcctgtga gagctgtgtc
361 ctgcaccgct catgctcgcc cggcttggg gtcaagcaga ttgtacagg ggtttctgat
421 accatctgag agccctgccc agtcggcttc ttctccaatg tgcctatgc ttctgaaaaa
481 tgtcacctt ggacaagctg tgagacaaa gaactggttg tgcaacaggc aggcacaaac
541 aagactgatg ttgtctgttg tcccaggat cggctgagag cctggtggt gatcccatc
601 atcttcggga tctgtttgc catcctctg gtgtggtct ttatcaaaa ggtggccaag
661 aagccaacca ataaggcccc ccacccaag caggaacccc aggagatcaa tticccgac
721 gatctctctg gctccaacac tgcgtctcca gtgcaggaga cttacatgg atgccaaccg
781 gtcaccagg aggatggcaa agagagtcgc atctcagtc aggagagaca gtga

```

FIGURA 12D

Isoforma larga codificada de DC40 para humano:

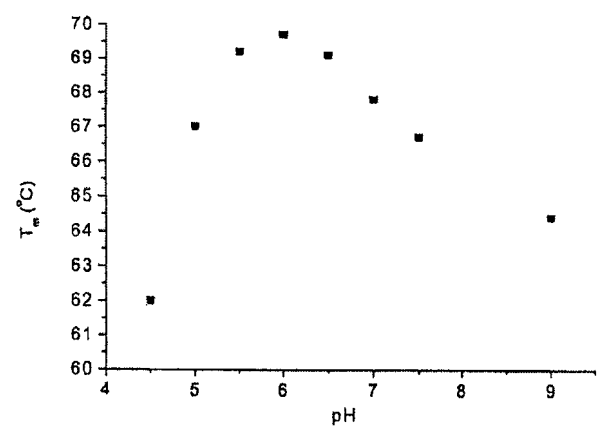
```

1 mvrplqcvi wgclltavhp epptacrekq ylnsqccsl cpggqklvsd cteftetecl
61 pcgesefldt wnrethchqh kydpnlglr vqkgtsetd tictceegwh ctseacescv
121 lhrscspgfg vkqiatgvsd ticepcpvgf fsnvssafek chpwtsctk dlrvqqagtn
181 ktdvvcgpgd rralvvipl ifgilfaill vlvfikkvak kptnkaphpk qepqeinfpd
241 dlpgsntaap vqetlhgcqp vtqedgkesr isvqerq

```

000001

FIGURA 13



000000

ANTICUERPOS ANTAGONISTAS ANTI-CD40 MONOCLONALES Y

MÉTODOS PARA SU USO

RESUMEN

La invención se relaciona anticuerpos humanos capaces de unirse a CD40, métodos de uso de los anticuerpos y métodos para el tratamiento de enfermedades mediadas por la estimulación de la señalización CD40 sobre células que expresan CD40. Específicamente con las composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades mediadas por la estimulación de señalización CD40 sobre células que expresan CD40. Las composiciones incluyen anticuerpos monoclonales capaces de unirse al antígeno CD40 humano localizado sobre la superficie de una célula que expresa CD40 humano, en donde la unión evita el crecimiento o la diferenciación de la célula. Las composiciones también incluyen anticuerpos monoclonales capaces de unirse específicamente al antígeno CD40 humano expresado sobre la superficie de una célula que expresa CD40 humano, dicho anticuerpo monoclonal está libre de actividad agonista significativa, en donde la administración de dicho anticuerpo monoclonal da como resultado significativamente menos volumen tumoral.

000263

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0043376

Bogotá D.C., Mayo 03 de 2012 - 14:30:53

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	43216	03/05/2012		205.000.00
RECIBO DE CA	999999999	43250	03/05/2012		3.600.000.00
RECIBO DE CA	999999999	43255	03/05/2012		1.274.000.00
RECIBO DE CA	999999999	43256	03/05/2012		750.000.00
RECIBO DE CA	999999999	43258	03/05/2012		555.000.00
RECIBO DE CA	999999999	43261	03/05/2012		100.000.00
RECIBO DE CA	999999999	43268	03/05/2012		87.000.00
RECIBO DE CA	999999999	43327	03/05/2012		160.000.00
RECIBO DE CA	999999999	43328	03/05/2012		185.500.00
RECIBO DE CA	999999999	43329	03/05/2012		100.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
			\$590.000.00

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 06-054042- -00011-0000
Fecha: 2012-05-09 15:25:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 265

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Mayo 3 de 2012 - 14:30:56

264

- / -

Bogotá D.C., Mayo 09 de 2012 - 14:55:24

NI 830,008,643

RE

120.000.00

\$450.000.00

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No.

Fecha: 2012-05-09 15:25:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONAL!
Act. 523 RESPUESTA Folios: 265

Mayo 9 de 2012 - 14:55:26

265