Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

P.C.T

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 06 54042

54. **TÍTULO** ANTICUERPOS ANTAGONISTAS ANTI-CD40 MONOCLONALES Y MÉTODOS PARA SU USO.

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** C07K 16/00; A61K 39/395

71. **SOLICITANTE** CHIRON CORPORATION

DOMICILIO EMERYVILLE, CA. USA.

74. **APODERADO** DELIA MARÍA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. **BOGOTÁ, D. C.,** JUNIO 5 /2006.

(FORMA P-10)

PETITO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-054042- -00000-0000
Fec: 2006-06-05 17:15:41 Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEIYII
Evo: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 468

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

1) SOLICITUD DE:

☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capitulo I. ☐ Capitulo II.

2) SOLICITANTE (71)	**Nombre: CHIRON CORPORATION** **Dirección: 4560 Horton Street, Emeryville, CA 94608-2916 Estados Unidos** **Nacionalidad o domicilio: Emeryville, CA, USA** **Lugar de constitución: California, USA**	**IDENTIFICACIÓN** **C.C.** ☐ **NIT:** ☐ **C.E.** ☐ **OTRO** ☐ **Cual** _____ **NÚMERO** _____
	Teléfono: Fax: **E. Mail:**	
3) REPRESENTANTE O APODERADO	**Nombre:** DILIA MARÍA RODRIGUEZ D´ALEMAN **Dirección:** Carrera 11 N°. 93-43 Of. 404 Bogotá D.C. **Teléfono:** 6350835 **Fax:** 6350824 **E. Mail:** clarkemodet@clarkemodet.com.co	**IDENTIFICACIÓN** **C.C.** ☒ **NIT:** ☐ **C.E.** ☐ **OTRO** ☐ **NÚMERO:** 41.654.882 **TP:** 20824 CSJ
4) INVENTOR (ES) (72)	**Nombre: 1. LONG, LI; 2. LUQMAN, Mohammada, 3. YABANNAVAR, Asha; 4. ZAROR, Isabel; 5. CHEN, Bao-Lu; 6. LU, Xiaofeng; 7. LEE, Sang, Hoon; 8. HURST, Deborah.** **Dirección: Todos los anteriores: Chiron Corporation, P:O: Box 8097, Emeryville, CA 94662-8097 USA.** **Nacionalidad o Domicilio: Todos los anteriores, California, Estados Unidos**	

5) PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/US2004/037152 Fecha: Nov. 4, 2004

Publicación Internacional No. WO2005/044854 A2 Fecha: Mayo 19, 2005

6)Título (54) ANTICUERPOS ANTAGONISTAS ANTI-CD40 MONOCLONALES Y MÉTODOS PARA SU USO

7) Clasificación Internacional: C07K 16/00

8) PRIORIDAD SI ☒ NO ☐

33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
Estados Unidos	N v. 4, 2003	60/517,337
Estados Unidos	Nov. 26, 2003	60/525,579
Estados Unidos	Abril 27, 2004	60/565,710

9) Comprobante de pago N° Fecha

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

p789 2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-054042- -00000-0000
Fec: 2006-06-05 17:16:41 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEYSI
Eve: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 498

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 40,120
FECHA : MAYO 26 DE 2006

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMBCONSIGNACION		BANCO POPULAR	050-00110-6	49045937	26/05/2006	12,022,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL : $	463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

10) ANEXOS

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- [ ] Comprobante de pago por reivindicación de prioridad .
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
- [x] Poderes, si fuera el caso
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- [ ] Declaraciones
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- [ ] Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cm
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [x] Otros:
  1. Reporte internacional de búsqueda
  2. Opinión escrita

11) FIGURA CARACTERÍSTICA:

12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE: DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA: _____

C.C. 41.654.882 de Bogota TP 20824 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
19 May 2005 (19.05.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/044854 A2

(51) International Patent Classification[7]: C07K 16/00

(21) International Application Number:
PCT/US2004/037152

(22) International Filing Date:
4 November 2004 (04.11.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/517,337	4 November 2003 (04.11.2003)	US
60/525,579	26 November 2003 (26.11.2003)	US
60/565,710	27 April 2004 (27.04.2004)	US

(71) Applicant (*for all designated States except US*): CHIRON CORPORATION [US/US]; 4560 Horton Street, Emeryville, CA 94608-2916 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): LONG, Li [CA/US]; Chiron Corporation, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662-8097 (US). LUQMAN, Mohammad [US/US]; Chiron Corporation, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662-8097 (US). YABANNAVAR, Asha [US/US]; Chiron Corporation, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662-8097 (US). ZAROR, Isabel [US/US]; Chiron Corporation, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662-8097 (US). CHEN, Rao-Lu [US/US]; Chiron Corporation, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662-8097 (US). LU, Xiaofeng [CN/US]; Chiron Corporation, P.O.Box 8097, Emeryville, CA 94662-8097 (US). LEE, Sang, Hoon [KR/US]; Chiron Corporation, P.O.Box 8097, Emeryville, CA 94662-8097 (US). HURST, Deborah [US/US]; Chiron Corporation, P.O.Box 8097, Emeryville, CA 94662-8097 (US).

(74) Agent: ALEXANDER, LISA, R.; Chiron Corporation, Intellectual Property Department, P.O.Box 8097, Emeryville, CA 94662-8097 (US).

(81) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2005/044854 A2

(54) Title: ANTAGONIST ANTI-CD40 MONOCLONAL ANTIBODIES AND METHODS FOR THEIR USE

(57) Abstract: Methods of therapy for treating diseases mediated by stimulation of CD40 signaling on CD40-expressing cells are provided. The methods comprise administering a therapeutically effective amount of an antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof to a patient in need thereof. The antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof is free of significant agonist activity, but exhibits antagonist activity when the antibody binds a CD40 antigen on a human CD40-expressing cell. Antagonist activity of the anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof beneficially inhibits proliferation and/or differentiation of human CD40expressing cells, such as B cells.

ANTAGONIST ANTI-CD40 MONOCLONAL ANTIBODIES AND METHODS FOR THEIR USE

FIELD OF THE INVENTION

The invention relates to human antibodies capable of binding to CD40, methods of using the antibodies, and methods for treatment of diseases mediated by stimulation of CD40 signaling on CD40-expressing cells.

BACKGROUND OF THE INVENTION

B cells play an important role during the normal *in vivo* immune response. A foreign antigen will bind to surface immunoglobulins on specific B cells, triggering a chain of events including endocytosis, processing, presentation of processed peptides on MHC-class II molecules, and up-regulation of the B7 antigen on the B cell surface. A specific T cell then binds to the B cell via T cell receptor (TCR) recognition of the processed antigen presented on the MHC-class II molecule. Stimulation through the TCR activates the T cell and initiates T-cell cytokine production. A second signal that further activates the T cell is an interaction between the CD28 antigen on T cells and the B7 antigen on B cells. When the above-mentioned signals are received, the CD40 ligand (CD40L or CD154), which is not expressed on resting human T cells, is up-regulated on the T-cell surface. Binding of the CD40 ligand to the CD40 antigen on the B cell surface stimulates the B cell, causing the B cell to mature into a plasma cell secreting high levels of soluble immunoglobulin.

CD40 is a 55 kDa cell-surface antigen present on the surface of both normal and neoplastic human B cells, dendritic cells, antigen presenting cells (APCs), endothelial cells, monocytic and epithelial cells. Transformed cells from patients with low- and high-grade B-cell lymphomas, B-cell acute lymphoblastic leukemia, multiple myeloma,

chronic lymphocytic leukemia, and Hodgkin's disease express CD40. CD40 expression is also detected in two-thirds of acute myeloblastic leukemia cases and 50% of AIDS-related lymphomas. Malignant B cells from several tumors of B-cell lineage express a high degree of CD40 and appear to depend on CD40 signaling for survival and proliferation.

Immunoblastic B-cell lymphomas frequently arise in immunocompromised individuals such as allograft recipients and others receiving long-term immunosuppressive therapy, AIDS patients, and patients with primary immunodeficiency syndromes such as X-linked lymphoproliferative syndrome or Wiscott-Aldrich syndrome (Thomas *et al.* (1991) *Adv. Cancer Res.* 57:329; Straus *et al.* (1993) *Ann. Intern. Med.* 118:45).

The CD40 antigen is related to the human nerve growth factor (NGF) receptor, tumor necrosis factor-α (TNF-α) receptor, and Fas, suggesting that CD40 is a receptor for a ligand with important functions in B-cell activation. CD40 expression on APCs plays an important co-stimulatory role in the activation of both T-helper and cytotoxic T lymphocytes. The CD40 receptor is expressed on activated T cells, activated platelets, and inflamed vascular smooth muscle cells. CD40 receptors can also be found on eosinophils, synovial membranes in rheumatoid arthritis, dermal fibroblasts, and other non-lymphoid cell types. Binding of CD40L to the CD40 receptor stimulates B-cell proliferation and differentiation, antibody production, isotype switching, and B-cell memory generation.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

Compositions and methods are provided for treating diseases mediated by stimulation of CD40 signaling on CD40-expressing cells, including lymphomas, autoimmune diseases, and transplant rejections. Compositions include monoclonal antibodies capable of binding to a human CD40 antigen located on the surface of a human CD40-expressing cell, wherein the binding prevents the growth or differentiation of the cell. Compositions also include monoclonal antibodies capable of specifically binding to a human CD40 antigen expressed on the surface of a human CD40-expressing cell, said monoclonal antibody being free of significant agonist activity, wherein

administration of said monoclonal antibody results in significantly less tumor volume than a similar concentration of the chimeric anti-CD20 monoclonal antibody IDEC-C2B8 in a staged nude mouse xenograft tumor model using the Daudi human B cell lymphoma cell line. Compositions also include antigen-binding fragments of these monoclonal antibodies, hybridoma cell lines producing these antibodies, and isolated nucleic acid molecules encoding the amino acid sequences of these monoclonal antibodies. The invention further includes pharamaceutical compositions comprising these anti-CD40 antibodies in a pharmaceutically acceptable carrier.

Methods are provided for preventing or treating a disease mediated by stimulation of CD40 signaling, comprising treating the patient with an anti-CD40 antibody or an antigen-binding fragment thereof that is free of significant agonist activity when bound to a CD40 antigen on a human CD40-expressing cell. Diseases mediated by stimulation of CD40-expressing cells include autoimmune diseases, cancers, and organ and tissue graft rejections. Lymphomas that can be treated or prevented by a method of the present invention include non-Hodgkin's lymphomas (high-grade lymphomas, intermediate-grade lymphomas, and low-grade lymphomas), Hodgkin's disease, acute lymphoblastic leukemias, myelomas, chronic lymphocytic leukemias, and myeloblastic leukemias.

Particular autoimmune diseases contemplated for treatment using the methods of the invention include systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis, Crohn's disease, psoriasis, autoimmune thrombocytopenic purpura, multiple sclerosis, ankylosing spondylitis, myasthenia gravis, and pemphigus vulgaris. Such antibodies could also be used to prevent rejection of organ and tissue grafts by suppressing autoimmune responses, to treat lymphomas by depriving malignant B lymphocytes of the activating signal provided by CD40, and to deliver toxins to CD40-bearing cells in a specific manner.

Methods for inhibiting the growth, differentiation, and/or proliferation of human B cells and for inhibiting antibody production by B cells in a human patient are provided, as are methods for inhibiting the growth of cancer cells of a B-cell lineage. Methods for identifying antibodies that have antagonist activity toward CD40-expressing cells are also provided.

The monoclonal antibodies disclosed herein have a strong affinity for CD40 and are characterized by a dissociation equilibrium constant (K_D) of at least 10^{-6} M, preferably at least about 10^{-7} M to about 10^{-8} M, more preferably at least about 10^{-8} M to about 10^{-12} M. Monoclonal antibodies and antigen-binding fragments thereof that are suitable for use in the methods of the invention are capable of specifically binding to a human CD40 antigen expressed on the surface of a human cell. They are free of significant agonist activity but exhibit antagonist activity when bound to CD40 antigen on human cells. In one embodiment, the anti-CD40 antibody or fragment thereof exhibits antagonist activity when bound to CD40 antigen on normal human B cells. In another embodiment, the anti-CD40 antibody or fragment thereof exhibits antagonist activity when bound to CD40 antigen on malignant human B cells. Suitable monoclonal antibodies have human constant regions; preferably they also have wholly or partially humanized framework regions; and most preferably are fully human antibodies or antigen-binding fragments thereof. Examples of such monoclonal antibodies are the antibodies designated herein as CHIR-5.9 and CHIR-12.12; the monoclonal antibodies produced by the hybridoma cell lines designated 131.2F8.5.9 (referred to herein as the cell line 5.9) and 153.8E2.D10.D6.12.12 (referred to herein as the cell line 12.12); a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:6, the sequence shown in SEQ ID NO:7, the sequence shown in SEQ ID NO:8, both the sequence shown in SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:7, and both the sequence shown in SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:8; a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:2, the sequence shown in SEQ ID NO:4, the sequence shown in SEQ ID NO:5, both the sequence shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4, and both the sequence shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:5; a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:1, the sequence shown in SEQ ID NO:3, and both the sequence shown in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:3; and antigen-binding fragments of these monoclonal antibodies that retain the capability of specifically binding to human CD40, and which are free of significant agonist activity but exhibit antagonist activity

when bound to CD40 antigen on human cells. Examples of such monoclonal antibodies also include a monoclonal antibody that binds to an epitope capable of binding the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 12.12; a monoclonal antibody that binds to an epitope comprising residues 82-87 of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12; a monoclonal antibody that competes with the monoclonal antibody CHIR-12.12 in a competitive binding assay; and a monoclonal antibody that is an antigen-binding fragment of the CHIR-12.12 monoclonal antibody or any of the foregoing monoclonal antibodies, where the fragment retains the capability of specifically binding to the human CD40 antigen. Those skilled in the art recognize that the antagonist antibodies and antigen-binding fragments of these antibodies disclosed herein include antibodies and antigen-binding fragments thereof that are produced recombinantly using methods well known in the art and described herein below, and include, for example, monoclonal antibodies CHIR-5.9 and CHIR-12.12 that have been recombinantly produced.

In one embodiment of the invention, methods of treatment comprise administering to a patient a therapeutically effective dose of a pharmaceutical composition comprising suitable antagonist anti-CD40 antibodies or antigen-binding fragments thereof. A therapeutically effective dose of the anti-CD40 antibody or fragment thereof is in the range from about 0.01 mg/kg to about 40 mg/kg, from about 0.01 mg/kg to about 30 mg/kg, from about 0.1 mg/kg to about 30 mg/kg, from about 1 mg/kg to about 30 mg/kg, from about 3 mg/kg to about 30 mg/kg, from about 3 mg/kg to about 25 mg/kg, from about 3 mg/kg to about 20 mg/kg, from about 5 mg/kg to about 15 mg/kg, or from about 7 mg/kg to about 12 mg/kg. It is recognized that the method of treatment may comprise a single administration of a therapeutically effective dose or multiple administrations of a therapeutically effective dose of the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof.

The antagonist anti-CD40 antibodies identified herein as being suitable for use in the methods of the invention may be modified. Modifications of these antagonist anti-CD40 antibodies include, but are not limited to, immunologically active chimeric anti-CD40 antibodies, humanized anti-CD40 antibodies, and immunologically active murine anti-CD40 antibodies.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows binding of CHIR-5.9 and CHIR-12.12 monoclonal antibodies to CD40 on the surface of lymphoma cell line (Ramos).

Figures 2A and 2B illustrate binding properties of the CHIR-5.9 and CHIR-12.12 monoclonal anti-CD40 antibodies relative toCD40 ligand. Figure 2A shows that binding of CHIR-5.9 and CHIR-12.12 monoclonal antibodies to cell surface CD40 prevents subsequent CD40-ligand binding. Figure 2B shows that the CHIR-5.9 and CHIR-12.12 monoclonal antibodies can compete off CD40 ligand pre-bound to cell surface CD40.

Figures 3A and 3B show ADCC activity of the candidate monoclonal antibodies CHIR-5.9 and CHIR-12.12 against cancer cells from the lymph nodes of non-Hodgkin's lymphoma (NHL) patients. Enriched NK cells from a normal volunteer donor either fresh after isolation (Figure 3A) or after culturing overnight at 37°C (Figure 3B) were used as effector cells in this assay. As NHL cells also express CD20, the target antigen for rituximab (Rituxan®), ADCC activity of the candidate mAbs was compared with that of rituximab.

Figure 4 demonstrates *in vivo* anti-tumor activity of monoclonal antibodies CHIR-5.9 and CHIR-12.12 compared to that of rituximab using an unstaged nude mouse xenograft B cell lymphoma (Namalwa) model.

Figure 5 demonstrates *in vivo* anti-tumor activity of monoclonal antibodies CHIR-5.9 and CHIR-12.12 compared to that of rituximab using an unstaged nude mouse xenograft B cell lymphoma (Daudi) model. RC, resistance to tumor challenge.

Figure 6 demonstrates *in vivo* anti-tumor activity of monoclonal antibodies CHIR-5.9 and CHIR-12.12 compared to that of rituximab using a staged nude mouse xenograft B cell lymphoma (Daudi) model. CR, complete regression.

Figure 7 shows the protocol used for determining the number of CD20 and CD40 molecules on Namalwa and Daudi cells.

Figure 8 shows comparative ADCC of the mAb CHIR-12.12 and rituximab against Daudi lymphoma cells.

Figure 9 sets forth the amino acid sequences for the light and heavy chains of the mAb CHIR-12.12. The leader (residues 1-20 of SEQ ID NO:2), variable (residues 21-132 of SEQ ID NO:2), and constant (residues 133-239 of SEQ ID NO:2) regions of the

light chain are shown in Figure 9A. The leader (residues 1-19 of SEQ ID NO:4), variable (residues 20-139 of SEQ ID NO:4), and constant (residues 140-469 of SEQ ID NO:4) regions of the heavy chain are shown in Figure 9B. The alternative constant region for the heavy chain of the mAb CHIR-12.12 shown in Figure 9B reflects a substitution of a serine residue for the alanine residue at position 153 of SEQ ID NO:4. The complete sequence for this variant of the heavy chain of the mAb CHIR-12.12 is set forth in SEQ ID NO:5.

Figure 10 shows the coding sequence for the light chain (Figure 10A; SEQ ID NO:1) and heavy chain (Figure 10B; SEQ ID NO:3) for the mAb CHIR-12.12.

Figure 11 sets forth the amino acid sequences for the light and heavy chains of mAb CHIR-5.9. The leader (residues 1-20 of SEQ ID NO:6), variable (residues 21-132 of SEQ ID NO:6), and constant (residues 133-239 of SEQ ID NO:6) regions of the light chain are shown in Figure 11A. The leader (residues 1-19 of SEQ ID NO:7), variable (residues 20-144 of SEQ ID NO:7), and constant (residues 145-474 of SEQ ID NO:7) regions of the heavy chain are shown in Figure 11B. The alternative constant region for the heavy chain of the mAb CHIR-5.9 shown in Figure 11B reflects a substitution of a serine residue for the alanine residue at position 158 of SEQ ID NO:7. The complete sequence for this variant of the heavy chain of the mAB CHIR-5.9 is set forth in SEQ ID NO:8.

Figure 12 shows the coding sequence (Figure 12A; SEQ ID NO:9) for the short isoform of human CD40 (amino acid sequence shown in Figure 12B; SEQ ID NO:10), and the coding sequence (Figure 12C; SEQ ID NO:11) for the long isoform of human CD40 (amino acid sequence shown in Figure 12D).

Figure 13 shows thermal melting temperature of CHIR-12.12 in different pH formulations measured by differential scanning calorimetry (DSC).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

"Tumor," as used herein, refers to all neoplastic cell growth and proliferation, whether malignant or benign, and all pre-cancerous and cancerous cells and tissues.

The terms "cancer" and "cancerous" refer to or describe the physiological condition in mammals that is typically characterized by unregulated cell growth. Examples of cancer include but are not limited to lymphoma and leukemia.

"Antibodies" and "immunoglobulins" (Igs) are glycoproteins having the same structural characteristics. While antibodies exhibit binding specificity to an antigen, immunoglobulins include both antibodies and other antibody-like molecules that lack antigen specificity. Polypeptides of the latter kind are, for example, produced at low levels by the lymph system and at increased levels by myelomas.

The term "antibody" is used in the broadest sense and covers fully assembled antibodies, antibody fragments that can bind antigen (e.g., Fab', $F(ab)_2$, Fv, single chain antibodies, diabodies), and recombinant peptides comprising the foregoing.

The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts.

"Native antibodies" and "native immunoglobulins" are usually heterotetrameric glycoproteins of about 150,000 daltons, composed of two identical light (L) chains and two identical heavy (H) chains. Each light chain is linked to a heavy chain by one covalent disulfide bond, while the number of disulfide linkages varies among the heavy chains of different immunoglobulin isotypes. Each heavy and light chain also has regularly spaced intrachain disulfide bridges. Each heavy chain has at one end a variable domain (V_H) followed by a number of constant domains. Each light chain has a variable domain at one end (V_L) and a constant domain at its other end; the constant domain of the light chain is aligned with the first constant domain of the heavy chain, and the light chain variable domain is aligned with the variable domain of the heavy chain. Particular amino acid residues are believed to form an interface between the light- and heavy-chain variable domains.

The term "variable" refers to the fact that certain portions of the variable domains differ extensively in sequence among antibodies and are used in the binding and specificity of each particular antibody for its particular antigen. However, the variability is not evenly distributed throughout the variable domains of antibodies. It is concentrated

in three segments called complementarity determining regions (CDRs) or hypervariable regions both in the light-chain and the heavy-chain variable domains. The more highly conserved portions of variable domains are called the framework (FR) regions. The variable domains of native heavy and light chains each comprise four FR regions, largely adopting a β-sheet configuration, connected by three CDRs, which form loops connecting, and in some cases forming part of, the β-sheet structure. The CDRs in each chain are held together in close proximity by the FR regions and, with the CDRs from the other chain, contribute to the formation of the antigen-binding site of antibodies (see Kabat *et al.* (1991) *NIH Publ. No. 91-3242*, Vol. I, pages 647-669).

The constant domains are not involved directly in binding an antibody to an antigen, but exhibit various effecter functions, such as Fc receptor (FcR) binding, participation of the antibody in antibody-dependent cellular toxicity, opsonization, initiation of complement dependent cytotoxicity, and mast cell degranulation.

The term "hypervariable region" when used herein refers to the amino acid residues of an antibody that are responsible for antigen binding. The hypervariable region comprises amino acid residues from a "complementarity determining region" or"CDR" (i.e., residues 24-34 (L1), 50-56 (L2), and 89-97 (L3) in the light-chain variable domain and 31-35 (H1), 50-65 (H2), and 95-102 (H3) in the heavy-chain variable domain; Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (5th ed., Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD) and/or those residues from a "hypervariable loop" (i.e., residues 26-32(L1), 50-52 (L2), and 91-96 (L3) in the light-chain variable domain and 26-32(H1), 53-55 (H2), and 96-101 (H3) in the heavy-chain variable domain; Clothia and Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917). "Framework" or "FR" residues are those variable domain residues other than the hypervariable region residues.

"Antibody fragments" comprise a portion of an intact antibody, preferably the antigen-binding or variable region of the intact antibody. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')2, and Fv fragments; diabodies; linear antibodies (Zapata *et al.* (1995) *Protein Eng.* 8(10):1057-1062); single-chain antibody molecules; and multispecific antibodies formed from antibody fragments. Papain digestion of antibodies produces two identical antigen-binding fragments, called "Fab" fragments, each with a

single antigen-binding site, and a residual "Fc" fragment, whose name reflects its ability to crystallize readily. Pepsin treatment yields an F(ab')2 fragment that has two antigen-combining sites and is still capable of cross-linking antigen.

"Fv" is the minimum antibody fragment that contains a complete antigen recognition and binding site. In a two-chain Fv species, this region consists of a dimer of one heavy- and one light-chain variable domain in tight, non-covalent association. In a single-chain Fv species, one heavy- and one light-chain variable domain can be covalently linked by flexible peptide linker such that the light and heavy chains can associate in a "dimeric" structure analogous to that in a two-chain Fv species. It is in this configuration that the three CDRs of each variable domain interact to define an antigen-binding site on the surface of the V_H-V_L dimer. Collectively, the six CDRs confer antigen-binding specificity to the antibody. However, even a single variable domain (or half of an Fv comprising only three CDRs specific for an antigen) has the ability to recognize and bind antigen, although at a lower affinity than the entire binding site.

The Fab fragment also contains the constant domain of the light chain and the first constant domain (C_H1) of the heavy chain. Fab fragments differ from Fab' fragments by the addition of a few residues at the carboxy terminus of the heavy-chain C_H1 domain including one or more cysteines from the antibody hinge region. Fab'-SH is the designation herein for Fab' in which the cysteine residue(s) of the constant domains bear a free thiol group. F(ab')2 antibody fragments originally were produced as pairs of Fab' fragments that have hinge cysteines between them. Other chemical couplings of antibody fragments are also known.

The "light chains" of antibodies (immunoglobulins) from any vertebrate species can be assigned to one of two clearly distinct types, called kappa (κ) and lambda (λ), based on the amino acid sequences of their constant domains.

Depending on the amino acid sequence of the constant domain of their heavy chains, immunoglobulins can be assigned to different classes. There are five major classes of human immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, and several of these may be further divided into subclasses (isotypes), e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, and IgA2. The heavy-chain constant domains that correspond to the different classes of immunoglobulins are called alpha, delta, epsilon, gamma, and mu, respectively. The

subunit structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well known. Different isotypes have different effector functions. For example, human IgG1 and IgG3 isotypes mediate antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) activity.

The word "label" when used herein refers to a detectable compound or composition that is conjugated directly or indirectly to the antibody so as to generate a "labeled" antibody. The label may be detectable by itself (e.g., radioisotope labels or fluorescent labels) or, in the case of an enzymatic label, may catalyze chemical alteration of a substrate compound or composition that is detectable. Radionuclides that can serve as detectable labels include, for example, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, and Pd-109. The label might also be a non-detectable entity such as a toxin.

The term "antagonist" is used in the broadest sense, and includes any molecule that partially or fully blocks, inhibits, or neutralizes a biological activity of a native target disclosed herein or the transcription or translation thereof.

"Carriers" as used herein include pharmaceutically acceptable carriers, excipients, or stabilizers that are nontoxic to the cell or mammal being exposed thereto at the dosages and concentrations employed. Often the physiologically acceptable carrier is an aqueous pH buffered solution. Examples of physiologically acceptable carriers include buffers such as phosphate, citrate, succinate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid; low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, arginine or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrins; chelating agents such as EDTA; sugar alcohols such as mannitol or sorbitol; salt-forming counterions such as sodium; and/or nonionic surfactants such as TWEEN, polyethylene glycol (PEG), and Pluronics. Administration "in combination with" one or more further therapeutic agents includes simultaneous (concurrent) and consecutive administration in any order.

A "host cell," as used herein, refers to a microorganism or a eukaryotic cell or cell line cultured as a unicellular entity that can be, or has been, used as a recipient for a

recombinant vector or other transfer polynucleotides, and include the progeny of the original cell that has been transfected. It is understood that the progeny of a single cell may not necessarily be completely identical in morphology or in genomic or total DNA complement as the original parent, due to natural, accidental, or deliberate mutation.

"Human effector cells" are leukocytes that express one or more FcRs and perform effector functions. Preferably, the cells express at least FcγRIII and carry out antigen-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) effector function. Examples of human leukocytes that mediate ADCC include peripheral blood mononuclear cells (PBMC), natural killer (NK) cells, monocytes, macrophages, eosinophils, and neutrophils, with PBMCs and NK cells being preferred. Antibodies that have ADCC activity are typically of the IgG1 or IgG3 isotype. Note that in addition to isolating IgG1 and IgG3 antibodies, such ADCC-mediating antibodies can be made by engineering a variable region from a non-ADCC antibody or variable region fragment to an IgG1 or IgG3 isotype constant region.

The terms "Fc receptor" or "FcR" are used to describe a receptor that binds to the Fc region of an antibody. The preferred FcR is a native-sequence human FcR. Moreover, a preferred FcR is one that binds an IgG antibody (a gamma receptor) and includes receptors of the FcγRI, FcγRII, and FcγRIII subclasses, including allelic variants and alternatively spliced forms of these receptors. FcγRII receptors include FcγRIIA (an "activating receptor") and FcγRIIB (an "inhibiting receptor"), which have similar amino acid sequences that differ primarily in the cytoplasmic domains thereof. Activating receptor FcγRIIA contains an immmunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) in its cytoplasmic domain. Inhibiting receptor FcγRIIB contains an immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) in its cytoplasmic domain (see Daeron (1997) *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234). FcRs are reviewed in Ravetch and Kinet (1991) *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991); Capel *et al.* (1994) *Immunomethods* 4:25-34; and de Haas *et al.* (1995) *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-341. Other FcRs, including those to be identified in the future, are encompassed by the term "FcR" herein. The term also includes the neonatal receptor, FcRn, which is responsible for the transfer of maternal IgGs to the fetus (Guyer *et al.* (1976) *J. Immunol.* 117:587 and Kim *et al.* (1994) *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

There are a number of ways to make human antibodies. For example, secreting cells can be immortalized by infection with the Epstein-Barr virus (EBV). However, EBV-infected cells are difficult to clone and usually produce only relatively low yields of immunoglobulin (James and Bell (1987) *J. Immunol. Methods* 100:5-40). In the future, the immortalization of human B cells might possibly be achieved by introducing a defined combination of transforming genes. Such a possibility is highlighted by a recent demonstration that the expression of the telomerase catalytic subunit together with the SV40 large oncoprotein and an oncogenic allele of H-ras resulted in the tumorigenic conversion of normal human epithelial and fibroblast cells (Hahn *et al.* (1999) *Nature* 400:464-468). It is now possible to produce transgenic animals (e.g., mice) that are capable, upon immunization, of producing a repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production (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; reviewed in Little *et al.* (2000) *Immunol. Today* 21:364-370). For example, it has been described that the homozygous deletion of the antibody heavy-chain joining region (J_H) gene in chimeric and germ-line mutant mice results in complete inhibition of endogenous antibody production (Jakobovits *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551-2555). Transfer of the human germ-line immunoglobulin gene array in such germ-line mutant mice results in the production of human antibodies upon antigen challenge (Jakobovits *et al.* (1993) *Nature* 362:255-258). Mendez *et al.* (1997) (*Nature Genetics* 15:146-156) have generated a line of transgenic mice that, when challenged with an antigen, generates high affinity fully-human antibodies. This was achieved by germ-line integration of megabase human heavy-chain and light-chain loci into mice with deletion into endogenous J_H segment as described above. These mice (XenoMouse® II technology (Abgenix; Fremont, California)) harbor 1,020 kb of human heavy-chain locus containing approximately 66 V_H genes, complete D_H and J_H regions, and three different constant regions, and also harbors 800 kb of human κ locus containing 32 Vκ genes, Jκ segments, and Cκ genes. The antibodies produced in these mice closely resemble that seen in humans in all respects, including gene rearrangement, assembly, and repertoire.

The human antibodies are preferentially expressed over endogenous antibodies due to deletion in endogenous segment that prevents gene rearrangement in the murine locus. Such mice may be immunized with an antigen of particular interest.

Sera from such immunized animals may be screened for antibody reactivity against the initial antigen. Lymphocytes may be isolated from lymph nodes or spleen cells and may further be selected for B cells by selecting for CD138-negative and CD19-positive cells. In one aspect, such B cell cultures (BCCs) may be fused to myeloma cells to generate hybridomas as detailed above.

In another aspect, such B cell cultures may be screened further for reactivity against the initial antigen, preferably. Such screening includes ELISA with the target/antigen protein, a competition assay with known antibodies that bind the antigen of interest, and in vitro binding to transiently transfected CHO or other cells that express the target antigen.

The present invention is directed to compositions and methods for treating human patients with diseases mediated by stimulation of CD40 signaling on CD40-expressing cells. The methods involve treatment with an anti-CD40 antibody of the invention, or an antigen-binding fragment thereof, where administration of the antibody or antigen-binding fragment thereof promotes a positive therapeutic response within the patient undergoing this method of therapy. Anti-CD40 antibodies suitable for use in the methods of the invention specifically bind a human CD40 antigen expressed on the surface of a human cell and are free of significant agonist activity, but exhibit antagonist activity when bound to the CD40 antigen on a human CD40-expressing cell. These anti-CD40 antibodies and antigen-binding fragments thereof are referred to herein as antagonist anti-CD40 antibodies. Such antibodies include, but are not limited to, the fully human monoclonal antibodies CHIR-5.9 and CHIR-12.12 described below and monoclonal antibodies having the binding characteristics of monoclonal antibodies CHIR-5.9 and CHIR-12.12. Those skilled in the art recognize that the antagonist antibodies and antigen-binding fragments of these antibodies disclosed herein include antibodies and antigen-binding fragments thereof that are produced recombinantly using methods well known in the art and described herein below, and include, for example, monoclonal antibodies CHIR-5.9 and CHIR-12.12 that have been recombinantly produced.

Antibodies that have the binding characteristics of monoclonal antibodies CHIR-5.9 and CHIR-12.12 include antibodies that competitively interfere with binding CD40 and/or bind the same epitopes as CHIR-5.9 and CHIR-12.12. One of skill could determine whether an antibody competitively interferes with CHIR-5.9 or CHIR-12.12 using standard methods.

When these antibodies bind CD40 displayed on the surface of human cells, such as human B cells, the antibodies are free of significant agonist activity; in some embodiments, their binding to CD40 displayed on the surface of human cells results in inhibition of proliferation and differentiation of these human cells. Thus, the antagonist anti-CD40 antibodies suitable for use in the methods of the invention include those monoclonal antibodies that can exhibit antagonist activity toward normal and malignant human cells expressing the cell-surface CD40 antigen.

In some embodiments, the anti-CD40 antibodies of the invention exhibit increased anti-tumor activity relative to the chimeric anti-CD20 monoclonal antibody IDEC-C2B8, where anti-tumor activity is assayed with equivalent amounts of these antibodies in a nude mouse xenograft tumor model using human lymphoma cell lines. IDEC-C2B8 (IDEC Pharmaceuticals Corp., San Diego, California; commercially available under the tradename Rituxan®, also referred to as rituximab) is a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody containing human IgG1 and kappa constant regions with murine variable regions isolated from a murine anti-CD20 monoclonal antibody, IDEC-2B8 (Reff *et al.* (1994) *Blood* 83:435-445). Rituximab® is licensed for treatment of relapsed B cell low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma (NHL). The discovery of antibodies with superior anti-tumor activity compared to Rituximab® could drastically improve methods of cancer therapy for B cell lymphomas, particularly B cell non-Hodgkin's lymphoma.

Suitable nude mouse xenograft tumor models include those using the human Burkitt's lymphoma cell lines known as Namalwa and Daudi. Preferred embodiments assay anti-tumor activity in a staged nude mouse xenograft tumor model using the Daudi human lymphoma cell line as described herein below in Example 17. A staged nude mouse xenograft tumor model using the Daudi lymphoma cell line is more effective at distinguishing the therapeutic efficacy of a given antibody than is an unstaged model, as

in the staged model antibody dosing is initiated only after the tumor has reached a measurable size. In the unstaged model, antibody dosing is initiated generally within about 1 day of tumor inoculation and before a palpable tumor is present. The ability of an antibody to outperform Rituxan® (i.e., to exhibit increased anti-tumor activity) in a staged model is a strong indication that the antibody will be more therapeutically effective than Rituxan®. Moreover, in the Daudi model, anti-CD20, the target for Rituxan® is expressed on the cell surface at a higher level than is CD40.

By "equivalent amount" of the anti-CD40 antibody of the invention and Rituxan® is intended the same mg dose is administered on a per weight basis. Thus, where the anti-CD40 antibody of the invention is dosed at 0.01 mg/kg body weight of the mouse used in the tumor model, Rituxan® is also dosed at 0.01 mg/kg body weight of the mouse. Similarly, where the anti-CD40antibody of the invention is dosed at 0.1, 1, or 10 mg/kg body weight of the mouse used in the tumor model, the Rituxan® is also dosed at 0.1, 1, or 10 mg/kg, respectively, of the body weight of the mouse.

When administered in the nude mouse xenograft tumor model, some antibodies of the invention result in significantly less tumor volume than an equivalent amount of Rituxan®. Thus, for example, the fully human monoclonal antibody CHIR-12.12 exhibits at least a 20% increase in anti-tumor activity relative to that observed with an equivalent dose of Rituxan when assayed in the staged nude mouse xenograft tumor model using the Daudi human lymphoma cell line in the manner described in Examples herein below, and can exhibit as much as a 50% to 60% increase in anti-tumor activity in this assay. This increased anti-tumor activity is reflected in the greater reduction in tumor volume observed with the anti-CD40 antibody of the invention when compared to the equivalent dose of Rituxan®. Thus, for example, depending upon the length of time after tumor inoculation, the monoclonal antibody CHIR-12.12 can exhibit a tumor volume that is about one-third to about one-half that observed for an equivalent dose of Rituxan®.

Another difference in antibody efficacy is to measure *in vitro* the concentration of antibody needed to obtain the maximum lysis of tumor cells *in vitro* in the presence of NK cells. For example, the anti-CD40 antibodies of the invention reach maximum lysis

of Daudi cells at an EC50 of less than ½, and preferably ¼, and most preferably, 1/10 the concentration of Rituxan®.

In addition to the monoclonal antibody CHIR-12.12, other anti-CD40 antibodies that would share the characteristics of having significantly greater efficacy than equivalent amounts of Rituxan® in the assays described above include, but are not limited to: (1) the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 12.12; (2) a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence in SEQ ID NO:2, the sequence in SEQ ID NO:4, the sequence in SEQ ID NO:5, both the sequence in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4, and both the sequence in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:5; (3) a monoclonal antibody having an amino acid sequence encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of the nucleotide sequence in SEQ ID NO:1, the nucleotide sequence in SEQ ID NO:3, and both the sequence in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:3; (4) a monoclonal antibody that binds to an epitope capable of binding the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 12.12; (5) a monoclonal antibody that binds to an epitope comprising residues 82-87 of the amino acid sequence in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12; (6) a monoclonal antibody that competes with the monoclonal antibody CHIR-12.12 in a competitive binding assay; and (7) a monoclonal antibody that is an antigen-binding fragment of the CHIR-12.12 monoclonal antibody or the foregoing monoclonal antibodies in preceding items (1)-(6), where the fragment retains the capability of specifically binding to the human CD40 antigen.

Antagonist Anti-CD40 Antibodies

The monoclonal antibodies CHIR-5.9 and CHIR-12.12 represent suitable antagonist anti-CD40 antibodies for use in the methods of the present invention. The CHIR-5.9 and CHIR-12.12 antibodies are fully human anti-CD40 monoclonal antibodies of the IgG_1 isotype produced from the hybridoma cell lines 131.2F8.5.9 (referred to herein as the cell line 5.9) and 153.8E2.D10.D6.12.12 (referred to herein as the cell line 12.12). These cell lines were created using splenocytes from immunized xenotypic mice containing the human IgG_1 heavy chain locus and the human κ chain locus (XenoMouse® technology; Abgenix; Fremont, California). The spleen cells were fused with the mouse

myeloma SP2/0 cells (Sierra BioSource). The resulting hybridomas were sub-cloned several times to create the stable monoclonal cell lines 5.9 and 12.12. Other antibodies of the invention may be prepared similarly using mice transgenic for human immunoglobulin loci or by other methods known in the art and/or described herein.

The nucleotide and amino acid sequences of the variable regions of the CHIR-12.12 antibody, and the amino acid sequences of the variable regions of the CHIR-5.9 antibody, are disclosed. More particularly, the amino acid sequences for the leader, variable, and constant regions for the light chain and heavy chain for mAb CHIR-12.12 are set forth in Figures 9A and 9B, respectively. See also SEQ ID NO:2 (complete sequence for the light chain of mAb CHIR-12.12), SEQ ID NO:4 (complete sequence for the heavy chain for mAb CHIR-12.12), and SEQ ID NO:5 (complete sequence for a variant of the heavy chain for mAb CHIR-12.12 set forth in SEQ ID NO:4, where the variant comprises a serine substitution for the alanine residue at position 153 of SEQ ID NO:4). The nucleotide sequences encoding the light chain and heavy chain for mAb CHIR-12.12 are set forth in Figures 11A and 11B, respectively. See also SEQ ID NO:1 (coding sequence for the light chain for mAb CHIR-12.12), and SEQ ID NO:3 (coding sequence for the heavy chain for mAb CHIR-12.12). The amino acid sequences for the leader, variable, and constant regions for the light chain and heavy chain of the CHIR-5.9 mAb are set forth in Figures 10A and 10B, respectively. See also SEQ ID NO:6 (complete sequence for the light chain of mAb CHIR-5.9), SEQ ID NO:7 (complete sequence for the heavy chain of mAb CHIR-5.9), and SEQ ID NO:8 (complete sequence for a variant of the heavy chain of mAb CHIR-5.9 set forth in SEQ ID NO:7, where the variant comprises a serine substitution for the alanine residue at position 158 of SEQ ID NO:7). Further, hybridomas expressing CHIR-5.9 and CHIR-12.12 antibodies have been deposited with the ATCC with a patent deposit designation of PTA-5542 and PTA-5543, respectively.

In addition to antagonist activity, it is preferable that anti-CD40 antibodies of this invention have another mechanism of action against a tumor cell. For example, native CHIR-5.9 and CHIR-12.12 antibodies have ADCC activity. Alternatively, the variable regions of the CHIR-5.9 and CHIR-12.12 antibodies can be expressed on another antibody isotype that has ADCC activity. It is also possible to conjugate native forms,

recombinant forms, or antigen-binding fragments of CHIR-5.9 or CHIR-12.12 to a cytotoxin, a therapeutic agent, or a radioactive metal ion or radioisotope, as noted herein below.

The CHIR-5.9 and CHIR-12.12 monoclonal antibodies bind soluble CD40 in ELISA-type assays, prevent the binding of CD40-ligand to cell-surface CD40, and displace the pre-bound CD40-ligand, as determined by flow cytometric assays. Antibodies CHIR-5.9 and CHIR-12.12 compete with each other for binding to CD40 but not with 15B8, the anti-CD40 monoclonal antibody described in U.S. Provisional Application Serial No. 60/237,556, titled "*Human Anti-CD40 Antibodies*," filed October 2, 2000, and PCT International Application No. PCT/US01/30857, also titled "*Human Anti-CD40 Antibodies*," filed October 2, 2001 (Attorney Docket No. PP16092.003), both of which are herein incorporated by reference in their entirety. When tested *in vitro* for effects on proliferation of B cells from normal human subjects, CHIR-5.9 and CHIR-12.12 act as antagonist anti-CD40 antibodies. Furthermore, CHIR-5.9 and CHIR-12.12 do not induce strong proliferation of human lymphocytes from normal subjects. These antibodies are able to kill CD40-expressing target cells by antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC). The binding affinity of CHIR-5.9 for human CD40 is 1.2×10^{-8} M and the binding affinity of CHIR-12.12 is 5×10^{-10} M, as determined by the Biacore™ assay.

Suitable antagonist anti-CD40 antibodies for use in the methods of the present invention exhibit a strong single-site binding affinity for the CD40 cell-surface antigen. The monoclonal antibodies of the invention exhibit a dissociation equilibrium constant (K_D) for CD40 of at least 10^{-5} M, at least 3×10^{-5} M, preferably at least 10^{-6} M to 10^{-7} M, more preferably at least 10^{-8} M to about 10^{-12} M, measured using a standard assay such as Biacore™. Biacore analysis is known in the art and details are provided in the "BIAapplications handbook." Methods described in WO 01/27160 can be used to modulate the binding affinity.

By "CD40 antigen," "CD40 cell surface antigen," "CD40 receptor," or "CD40" is intended a transmembrane glycoprotein that belongs to the tumor necrosis factor (TNF) receptor family (see, for example, U.S. Patent Nos. 5,674,492 and 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)). Two isoforms of human CD40, encoded by alternatively spliced transcript variants of this gene, have been identified. The first isoform (also known as the "long isoform" or "isoform 1") is expressed as a 277-amino-acid precursor polypeptide (SEQ ID NO:12 (first reported as GenBank Accession No. CAA43045, and identified as isoform 1 in GenBank Accession No. NP_001241), encoded by SEQ ID NO:11 (see GenBank Accession Nos. X60592 and NM_001250)), which has a signal sequence represented by the first 19 residues. The second isoform (also known as the "short isoform" or "isoform 2") is expressed as a 203-amino-acid precursor polypeptide (SEQ ID NO:10 (GenBank Accession No. NP_690593), encoded by SEQ ID NO:9 (GenBank Accession No. NM_152854)), which also has a signal sequence represented by the first 19 residues. The precursor polypeptides of these two isoforms of human CD40 share in common their first 165 residues (i.e., residues 1-165 of SEQ ID NO:10 and SEQ ID NO:12). The precursor polypeptide of the short isoform (shown in SEQ ID NO:10) is encoded by a transcript variant (SEQ ID NO:9) that lacks a coding segment, which leads to a translation frame shift; the resulting CD40 isoform contains a shorter and distinct C-terminus (residues 166-203 of SEQ ID NO:10) from that contained in the long isoform of CD40 (C-terminus shown in residues 166-277 of SEQ ID NO:12). For purposes of the present invention, the term "CD40 antigen," "CD40 cell surface antigen," "CD40 receptor," or "CD40" encompasses both the short and long isoforms of CD40. The anti-CD40 antibodies of the present invention bind to an epitope of human CD40 that resides at the same location within either the short isoform or long isoform of this cell surface antigen as noted herein below.

The CD40 antigen is displayed on the surface of a variety of cell types, as described elsewhere herein. By "displayed on the surface" and "expressed on the surface" is intended that all or a portion of the CD40 antigen is exposed to the exterior of the cell. The displayed or expressed CD40 antigen may be fully or partially glycosylated.

By "agonist activity" is intended that the substance functions as an agonist. An agonist combines with a receptor on a cell and initiates a reaction or activity that is similar to or the same as that initiated by the receptor's natural ligand. An agonist of CD40 induces any or all of, but not limited to, the following responses: B cell

proliferation and differentiation, antibody production, intercellular adhesion, B cell memory generation, isotype switching, up-regulation of cell-surface expression of MHC Class II and CD80/86, and secretion of pro-inflammatory cytokines such as IL-8, IL-12, and TNF. By "antagonist activity" is intended that the substance functions as an antagonist. An antagonist of CD40 prevents or reduces induction of any of the responses induced by binding of the CD40 receptor to an agonist ligand, particularly CD40L. The antagonist may reduce induction of any one or more of the responses to agonist binding by 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, preferably 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, more preferably 70%, 80%, 85%, and most preferably 90%, 95%, 99%, or 100%. Methods for measuring anti-CD40 antibody and CD40-ligand binding specificity and antagonist activity are known to one of skill in the art and include, but are not limited to, standard competitive binding assays, assays for monitoring immunoglobulin secretion by B cells, B cell proliferation assays, Banchereau-Like-B cell proliferation assays, T cell helper assays for antibody production, co-stimulation of B cell proliferation assays, and assays for up-regulation of B cell activation markers. See, for example, such assays disclosed in WO 00/75348 and U.S. Patent No. 6,087,329, herein incorporated by reference.

By "significant" agonist activity is intended an agonist activity of at least 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, or 100% greater than the agonist activity induced by a neutral substance or negative control as measured in an assay of a B cell response. Preferably, "significant" agonist activity is an agonist activity that is at least 2-fold greater or at least 3-fold greater than the agonist activity induced by a neutral substance or negative control as measured in an assay of a B cell response. Thus, for example, where the B cell response of interest is B cell proliferation, "significant" agonist activity would be induction of a level of B cell proliferation that is at least 2-fold greater or at least 3-fold greater than the level of B cell proliferation induced by a neutral substance or negative control. In one embodiment, a non-specific immunoglobulin, for example IgG1, that does not bind to CD40 serves as the negative control. A substance "free of significant agonist activity" would exhibit an agonist activity of not more than about 25% greater than the agonist activity induced by a neutral substance or negative control, preferably not more than about 20% greater, 15% greater, 10% greater, 5% greater, 1% greater, 0.5% greater, or even not more than about 0.1%

greater than the agonist activity induced by a neutral substance or negative control as measured in an assay of a B cell response. The antagonist anti-CD40 antibodies useful in the methods of the present invention are free of significant agonist activity as noted above when bound to a CD40 antigen on a human cell. In one embodiment of the invention, the antagonist anti-CD40 antibody is free of significant agonist activity in one B cell response. In another embodiment of the invention, the antagonist anti-CD40 antibody is free of significant agonist activity in assays of more than one B cell response (e.g., proliferation and differentiation, or proliferation, differentiation, and antibody production).

As used herein "anti-CD40 antibody" encompasses any antibody that specifically recognizes the CD40 B cell surface antigen, including polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, single-chain antibodies, and fragments thereof such as Fab, $F(ab')_2$, F_v, and other fragments which retain the antigen binding function of the parent anti-CD40 antibody. Of particular interest to the present invention are the antagonist anti-CD40 antibodies disclosed herein that share the binding characteristics of the monoclonal antibodies CHIR-5.9 and CHIR-12.12 described above. Such antibodies include, but are not limited to the following: (1) the monoclonal antibodies produced by the hybridoma cell lines designated 131.2F8.5.9 (referred to herein as the cell line 5.9) and 153.8E2.D10.D6.12.12 (referred to herein as the cell line 12.12), deposited with the ATCC as Patent Deposit No. PTA-5542 and Patent Deposit No. PTA-5543, respectively; (2) a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:2, the sequence shown in SEQ ID NO:4, the sequence shown in SEQ ID NO:5, both the sequences shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4, and both the sequences shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:5; (3) a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:6, the sequence shown in SEQ ID NO:7, the sequence shown in SEQ ID NO:8, both the sequences shown in SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:7, and both the sequences shown in SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:8; (4) a monoclonal antibody having an amino acid sequence encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, the nucleotide sequence shown in SEQ ID

NO:3, and both the sequences shown in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:3; (5) a monoclonal antibody that binds to an epitope capable of binding the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 5.9 or the hybridoma cell line 12.12; (6) a monoclonal antibody that binds to an epitope comprising residues 82-87 of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12; (7) a monoclonal antibody that competes with the monoclonal antibody CHIR-5.9 or CHIR-12.12 in a competitive binding assay; and (8) a monoclonal antibody that is an antigen-binding fragment of the CHIR-12.12 or CHIR-5.9 monoclonal antibody or the foregoing monoclonal antibodies in preceding items (1)-(7), where the fragment retains the capability of specifically binding to the human CD40 antigen.

Production of Antagonist Anti-CD40 Antibodies

The antagonist anti-CD40 antibodies disclosed herein and for use in the methods of the present invention can be produced using any antibody production method known to those of skill in the art. Thus, polyclonal sera may be prepared by conventional methods. In general, a solution containing the CD40 antigen is first used to immunize a suitable animal, preferably a mouse, rat, rabbit, or goat. Rabbits or goats are preferred for the preparation of polyclonal sera due to the volume of serum obtainable, and the availability of labeled anti-rabbit and anti-goat antibodies.

Polyclonal sera can be prepared in a transgenic animal, preferably a mouse bearing human immunoglobulin loci. In a preferred embodiment, Sf9 cells expressing CD40 are used as the immunogen. Immunization can also be performed by mixing or emulsifying the antigen-containing solution in saline, preferably in an adjuvant such as Freund's complete adjuvant, and injecting the mixture or emulsion parenterally (generally subcutaneously or intramuscularly). A dose of 50-200 μg/injection is typically sufficient. Immunization is generally boosted 2-6 weeks later with one or more injections of the protein in saline, preferably using Freund's incomplete adjuvant. One may alternatively generate antibodies by *in vitro* immunization using methods known in the art, which for the purposes of this invention is considered equivalent to *in vivo* immunization. Polyclonal antisera are obtained by bleeding the immunized animal into a glass or plastic container, incubating the blood at 25°C for one hour, followed by incubating at 4°C for 2-

18 hours. The serum is recovered by centrifugation (e.g., 1,000 x g for 10 minutes). About 20-50 ml per bleed may be obtained from rabbits.

Production of the Sf 9 (*Spodoptera frugiperda*) cells is disclosed in U.S. Patent No. 6,004,552, incorporated herein by reference. Briefly, sequences encoding human CD40 were recombined into a baculovirus using transfer vectors. The plasmids were co-transfected with wild-type baculovirus DNA into Sf 9 cells. Recombinant baculovirus-infected Sf 9 cells were identified and clonally purified.

Preferably the antibody is monoclonal in nature. By "monoclonal antibody" is intended an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. The term is not limited regarding the species or source of the antibody. The term encompasses whole immunoglobulins as well as fragments such as Fab, F(ab')2, Fv, and others which retain the antigen binding function of the antibody. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic site, i.e., the CD40 cell surface antigen in the present invention. Furthermore, in contrast to conventional (polyclonal) antibody preparations that typically include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen. The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by the hybridoma method first described by Kohler *et al.* (1975) *Nature* 256:495, or may be made by recombinant DNA methods (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 4,816,567). The "monoclonal antibodies" may also be isolated from phage antibody libraries using the techniques described in, for example, Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597; and U.S. Patent No. 5,514,548.

By "epitope" is intended the part of an antigenic molecule to which an antibody is produced and to which the antibody will bind. Epitopes can comprise linear amino acid residues (i.e., residues within the epitope are arranged sequentially one after another in a

linear fashion), nonlinear amino acid residues (referred to herein as "nonlinear epitopes"; these epitopes are not arranged sequentially), or both linear and nonlinear amino acid residues.

Monoclonal antibodies can be prepared using the method of Kohler *et al.* (1975) *Nature* 256:495-496, or a modification thereof. Typically, a mouse is immunized with a solution containing an antigen. Immunization can be performed by mixing or emulsifying the antigen-containing solution in saline, preferably in an adjuvant such as Freund's complete adjuvant, and injecting the mixture or emulsion parenterally. Any method of immunization known in the art may be used to obtain the monoclonal antibodies of the invention. After immunization of the animal, the spleen (and optionally, several large lymph nodes) are removed and dissociated into single cells. The spleen cells may be screened by applying a cell suspension to a plate or well coated with the antigen of interest. The B cells expressing membrane bound immunoglobulin specific for the antigen bind to the plate and are not rinsed away. Resulting B cells, or all dissociated spleen cells, are then induced to fuse with myeloma cells to form hybridomas, and are cultured in a selective medium. The resulting cells are plated by serial dilution and are assayed for the production of antibodies that specifically bind the antigen of interest (and that do not bind to unrelated antigens). The selected monoclonal antibody (mAb)-secreting hybridomas are then cultured either *in vitro* (e.g., in tissue culture bottles or hollow fiber reactors), or *in vivo* (as ascites in mice).

Where the antagonist anti-CD40 antibodies of the invention are to be prepared using recombinant DNA methods, the DNA encoding the monoclonal antibodies is readily isolated and sequenced using conventional procedures (*e.g.*, by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of murine antibodies). The hybridoma cells described herein serve as a preferred source of such DNA. Once isolated, the DNA may be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as *E. coli* cells, simian COS cells, Chinese Hamster Ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. Review articles on recombinant expression in bacteria of DNA encoding the antibody include Skerra *et al.* (1993) *Curr. Opinion in Immunol.* 5:256 and

Phickthun (1992) *Immunol. Revs.* 130:151. Alternatively, antibody can be produced in a cell line such as a CHO cell line, as disclosed in U.S. Patent Nos. 5,545,403; 5,545,405; and 5,998,144; incorporated herein by reference. Briefly the cell line is transfected with vectors capable of expressing a light chain and a heavy chain, respectively. By transfecting the two proteins on separate vectors, chimeric antibodies can be produced. Another advantage is the correct glycosylation of the antibody.

In some embodiments, the antagonist anti-CD40 antibody, for example, the CHIR-12.12 or CHIR-5.9 antibody, or antigen-binding fragment thereof is produced in CHO cells using the GS gene expression system (Lonza Biologics, Portsmouth, New Hampshire), which uses glutamine synthetase as a marker. See, also U.S. Patent Nos. 5,122,464; 5,591,639; 5,658,759; 5,770,359; 5,827,739; 5,879,936; 5,891,693; and 5,981,216; the contents of which are herein incorporated by reference in their entirety.

Monoclonal antibodies to CD40 are known in the art. See, for example, the sections dedicated to B-cell antigen in McMichael, ed. (1987; 1989) *Leukocyte Typing III and IV* (Oxford University Press, New York); U.S. Patent Nos. 5,674,492; 5,874,082; 5,677,165; 6,056,959; WO 00/63395; International Publication Nos. WO 02/28905 and 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; and Banchereau *et al.* (1991) *Science* 251:70; all of which are herein incorporated by reference. Of particular interest to the present invention are the antagonist anti-CD40 antibodies disclosed herein that share the binding characteristics of the monoclonal antibodies CHIR-5.9 and CHIR-12.12 described above.

The term "CD40-antigen epitope" as used herein refers to a molecule that is capable of immunoreactivity with the anti-CD40 monoclonal antibodies of this invention, excluding the CD40 antigen itself. CD40-antigen epitopes may comprise proteins, protein fragments, peptides, carbohydrates, lipids, and other molecules, but for the purposes of the present invention are most commonly proteins, short oligopeptides, oligopeptide mimics (i e, organic compounds which mimic the antibody binding

properties of the CD40 antigen), or combinations thereof. Suitable oligopeptide mimics are described, inter alia, in PCT application US 91/04282.

Additionally, the term "anti-CD40 antibody" as used herein encompasses chimeric anti-CD40 antibodies; such chimeric anti-CD40 antibodies for use in the methods of the invention have the binding characteristics of the CHIR-5.9 and CHIR-12.12 monoclonal antibodies described herein. By "chimeric" antibodies is intended antibodies that are most preferably derived using recombinant deoxyribonucleic acid techniques and which comprise both human (including immunologically "related" species, e.g., chimpanzee) and non-human components. Thus, the constant region of the chimeric antibody is most preferably substantially identical to the constant region of a natural human antibody; the variable region of the chimeric antibody is most preferably derived from a non-human source and has the desired antigenic specificity to the CD40 cell-surface antigen. The non-human source can be any vertebrate source that can be used to generate antibodies to a human CD40 cell-surface antigen or material comprising a human CD40 cell-surface antigen. Such non-human sources include, but are not limited to, rodents (e.g., rabbit, rat, mouse, etc.; see, for example, U.S. Patent No. 4,816,567, herein incorporated by reference) and non-human primates (e.g., Old World Monkey, Ape, etc.; see, for example, U.S. Patent Nos. 5,750,105 and 5,756,096; herein incorporated by reference). As used herein, the phrase "immunologically active" when used in reference to chimeric anti-CD40 antibodies means a chimeric antibody that binds human CD40.

Chimeric and humanized anti-CD40 antibodies are also encompassed by the term anti-CD40 antibody as used herein. Chimeric antibodies comprise segments of antibodies derived from different species. Rituxan® is an example of a chimeric antibody with a murine variable region and a human constant region.

By "humanized" is intended forms of anti-CD40 antibodies that contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin sequences. For the most part, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a hypervariable region (also known as complementarity determining region or CDR) of the recipient are replaced by residues from a hypervariable region of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat, rabbit, or nonhuman primate having

the desired specificity, affinity, and capacity. The phrase "complementarity determining region" refers to amino acid sequences which together define the binding affinity and specificity of the natural Fv region of a native immunoglobulin binding site. See, e.g., Chothia *et al* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Kabat *et al* (1991) U. S. Dept. of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). The phrase "constant region" refers to the portion of the antibody molecule that confers effector functions. In previous work directed towards producing non-immunogenic antibodies for use in therapy of human disease, mouse constant regions were substituted by human constant regions. The constant regions of the subject humanized antibodies were derived from human immunoglobulins. However, these humanized antibodies still elicited an unwanted and potentially dangerous immune response in humans and there was a loss of affinity. Humanized anti-CD40 antibodies for use in the methods of the present invention have binding characteristics similar to those exhibited by the CHIR-5.9 and CHIR-12.12 monoclonal antibodies described herein.

Humanization can be essentially performed following the method of Winter and co-workers (Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyen *et al.* (1988) *Science* 239:1534-1536), by substituting rodent or mutant rodent CDRs or CDR sequences for the corresponding sequences of a human antibody. See also U.S. Patent Nos. 5,225,539; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; 5,859,205; herein incorporated by reference. In some instances, residues within the framework regions of one or more variable regions of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues (see, for example, U.S. Patent Nos. 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; and 6,180,370). Furthermore, humanized antibodies may comprise residues that are not found in the recipient antibody or in the donor antibody. These modifications are made to further refine antibody performance (e.g., to obtain desired affinity). In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the hypervariable regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the framework regions are those of a human immunoglobulin sequence. The humanized antibody optionally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. For

further details see 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; herein incorporated by reference. Accordingly, such "humanized" antibodies may include antibodies wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some CDR residues and possibly some framework residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies. See, for example, U.S. Patent Nos. 5,225,539; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; 5,859,205. See also U.S. Patent No. 6,180,370, and International Publication No. WO 01/27160, where humanized antibodies and techniques for producing humanized antibodies having improved affinity for a predetermined antigen are disclosed.

Also encompassed by the term anti-CD40 antibodies are xenogeneic or modified anti-CD40 antibodies produced in a non-human mammalian host, more particularly a transgenic mouse, characterized by inactivated endogenous immunoglobulin (Ig) loci. In such transgenic animals, competent endogenous genes for the expression of light and heavy subunits of host immunoglobulins are rendered non-functional and substituted with the analogous human immunoglobulin loci. These transgenic animals produce human antibodies in the substantial absence of light or heavy host immunoglobulin subunits. See, for example, U.S. Patent Nos. 5,877,397 and 5,939,598, herein incorporated by reference.

Preferably, fully human antibodies to CD40 are obtained by immunizing transgenic mice. One such mouse is obtained using XenoMouse® technology (Abgenix; Fremont, California), and is disclosed in U.S. Patent Nos. 6,075,181, 6,091,001, and 6,114,598, all of which are incorporated herein by reference. To produce the antibodies disclosed herein, mice transgenic for the human Ig G_1 heavy chain locus and the human κ light chain locus were immunized with Sf 9 cells expressing human CD40. Mice can also be transgenic for other isotypes. Fully human antibodies useful in the methods of the present invention are characterized by binding properties similar to those exhibited by the CHIR-5.9 and CHIR-12.12 monoclonal antibodies disclosed herein.

Fragments of the anti-CD40 antibodies are suitable for use in the methods of the invention so long as they retain the desired affinity of the full-length antibody. Thus, a

fragment of an anti-CD40 antibody will retain the ability to bind to the CD40 B cell surface antigen. Such fragments are characterized by properties similar to the corresponding full-length antagonist anti-CD40 antibody, that is, the fragments will specifically bind a human CD40 antigen expressed on the surface of a human cell, and are free of significant agonist activity but exhibit antagonist activity when bound to a CD40 antigen on a human CD40-expressing cell. Such fragments are referred to herein as "antigen-binding" fragments.

Suitable antigen-binding fragments of an antibody comprise a portion of a full-length antibody, generally the antigen-binding or variable region thereof. Examples of antibody fragments include, but are not limited to, Fab, $F(ab')_2$, and Fv fragments and single-chain antibody molecules. By "Fab" is intended a monovalent antigen-binding fragment of an immunoglobulin that is composed of the light chain and part of the heavy chain. By $F(ab')_2$ is intended a bivalent antigen-binding fragment of an immunoglobulin that contains both light chains and part of both heavy chains. By "single-chain Fv" or "sFv" antibody fragments is intended fragments comprising the V_H and V_L domains of an antibody, wherein these domains are present in a single polypeptide chain. See, for example, U.S. Patent Nos. 4,946,778, 5,260,203, 5,455,030, and 5,856,456, herein incorporated by reference. Generally, the Fv polypeptide further comprises a polypeptide linker between the V_H and V_L domains that enables the sFv to form the desired structure for antigen binding. For a review of sFv see Pluckthun (1994) in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, ed. Rosenburg and Moore (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315. Antigen-binding fragments of the antagonist anti-CD40 antibodies disclosed herein can also be conjugated to a cytotoxin to effect killing of the target cancer cells, as described herein below.

Antibodies or antibody fragments can be isolated from antibody phage libraries generated using the techniques described in, for example, McCafferty *et al.* (1990) *Nature* 348:552-554 (1990) and U.S. Patent No. 5,514,548. Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628 and Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597 describe the isolation of murine and human antibodies, respectively, using phage libraries. Subsequent publications describe the production of high affinity (nM range) human antibodies by chain shuffling (Marks *et al.* (1992) *Bio/Technology* 10:779-783), as well

as combinatorial infection and *in vivo* recombination as a strategy for constructing very large phage libraries (Waterhouse *et al.* (1993) *Nucleic. Acids Res.* 21:2265-2266). Thus, these techniques are viable alternatives to traditional monoclonal antibody hybridoma techniques for isolation of monoclonal antibodies.

Various techniques have been developed for the production of antibody fragments. Traditionally, these fragments were derived *via* proteolytic digestion of intact antibodies (see, e.g., Morimoto *et al.* (1992) *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) and Brennan *et al.* (1985) *Science* 229:81). However, these fragments can now be produced directly by recombinant host cells. For example, the antibody fragments can be isolated from the antibody phage libraries discussed above. Alternatively, Fab'-SH fragments can be directly recovered from *E. coli* and chemically coupled to form $F(ab')_2$ fragments (Carter *et al.* (1992) *Bio/Technology* 10:163-167). According to another approach, $F(ab')_2$ fragments can be isolated directly from recombinant host cell culture. Other techniques for the production of antibody fragments will be apparent to the skilled practitioner.

Antagonist anti-CD40 antibodies useful in the methods of the present invention include the CHIR-5.9 and CHIR-12.12 monoclonal antibodies disclosed herein as well as antibodies differing from this antibody but retaining the CDRs; and antibodies with one or more amino acid addition(s), deletion(s), or substitution(s), wherein the antagonist activity is measured by inhibition of B-cell proliferation and/or differentiation. The invention also encompasses de-immunized antagonist anti-CD40 antibodies, which can be produced as described in, for example, International Publication Nos. WO 98/52976 and WO 0034317; herein incorporated by reference. In this manner, residues within the antagonist anti-CD40 antibodies of the invention are modified so as to render the antibodies non- or less immunogenic to humans while retaining their antagonist activity toward human CD40-expressing cells, wherein such activity is measured by assays noted elsewhere herein. Also included within the scope of the claims are fusion proteins comprising an antagonist anti-CD40 antibody of the invention, or a fragment thereof, which fusion proteins can be synthesized or expressed from corresponding polynucleotide vectors, as is known in the art. Such fusion proteins are described with reference to conjugation of antibodies as noted below.

The antibodies of the present invention can have sequence variations produced using methods described in, for example, Patent Publication Nos. EP 0 983 303 A1, WO 00/34317, and WO 98/52976, incorporated herein by reference. For example, it has been shown that sequences within the CDR can cause an antibody to bind to MHC Class II and trigger an unwanted helper T-cell response. A conservative substitution can allow the antibody to retain binding activity yet lose its ability to trigger an unwanted T-cell response. Any such conservative or non-conservative substitutions can be made using art-recognized methods, such as those noted elsewhere herein, and the resulting antibodies will fall within the scope of the invention. The variant antibodies can be routinely tested for antagonist activity, affinity, and specificity using methods described herein.

An antibody produced by any of the methods described above, or any other method not disclosed herein, will fall within the scope of the invention if it possesses at least one of the following biological activities: inhibition of immunoglobulin secretion by normal human peripheral B cells stimulated by T cells; inhibition of survival and/or proliferation of normal human peripheral B cells stimulated by Jurkat T cells; inhibition of survival and/or proliferation of normal human peripheral B cells stimulated by CD40L-expressing cells or soluble CD40 ligand (sCD40L); inhibition of "survival" anti-apoptotic intracellular signals in any cell stimulated by sCD40L or solid-phase CD40L; inhibition of CD40 signal transduction in any cell upon ligation with sCD40L or solid-phase CD40L; and inhibition of proliferation of human malignant B cells as noted below. These assays can be performed as described in the Examples herein. See also the assays described in 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; and U.S. Patent Nos. 5,674,492 and 5,847,082; herein incorporated by reference.

A representative assay to detect antagonist anti-CD40 antibodies specific to the CD40-antigen epitopes identified herein is a "competitive binding assay." Competitive binding assays are serological assays in which unknowns are detected and quantitated by

their ability to inhibit the binding of a labeled known ligand to its specific antibody. This is also referred to as a competitive inhibition assay. In a representative competitive binding assay, labeled CD40 polypeptide is precipitated by candidate antibodies in a sample, for example, in combination with monoclonal antibodies raised against one or more epitopes of the monoclonal antibodies of the invention. Anti-CD40 antibodies that specifically react with an epitope of interest can be identified by screening a series of antibodies prepared against a CD40 protein or fragment of the protein comprising the particular epitope of the CD40 protein of interest. For example, for human CD40, epitopes of interest include epitopes comprising linear and/or nonlinear amino acid residues of the short isoform of human CD40 (see GenBank Accession No. NP_690593) set forth in Figure 12B (SEQ ID NO:10), encoded by the sequence set forth in Figure 12A (SEQ ID NO:9; see also GenBank Accession No. NM_152854), or of the long isoform of human CD40 (see GenBank Accession Nos. CAA43045 and NP_001241) set forth in Figure 12D (SEQ ID NO:12), encoded by the sequence set forth in Figure 12C (SEQ ID NO:11; see GenBank Accession Nos. X60592 and NM_001250). Alternatively, competitive binding assays with previously identified suitable antagonist anti-CD40 antibodies could be used to select monoclonal antibodies comparable to the previously identified antibodies.

Antibodies employed in such immunoassays may be labeled or unlabeled. Unlabeled antibodies may be employed in agglutination; labeled antibodies may be employed in a wide variety of assays, employing a wide variety of labels. Detection of the formation of an antibody-antigen complex between an anti-CD40 antibody and an epitope of interest can be facilitated by attaching a detectable substance to the antibody. Suitable detection means include the use of labels such as radionuclides, enzymes, coenzymes, fluorescers, chemiluminescers, chromogens, enzyme substrates or co-factors, enzyme inhibitors, prosthetic group complexes, free radicals, particles, dyes, and the like. Examples of suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, β-galactosidase, or acetylcholinesterase; examples of suitable prosthetic group complexes include streptavidin/biotin and avidin/biotin; examples of suitable fluorescent materials include umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride or phycoerythrin; an example of a

luminescent material is luminol; examples of bioluminescent materials include luciferase, luciferin, and aequorin; and examples of suitable radioactive material include ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S, or ^{3}H. Such labeled reagents may be used in a variety of well-known assays, such as radioimmunoassays, enzyme immunoassays, e.g., ELISA, fluorescent immunoassays, and the like. See for example, U.S. Patent Nos. 3,766,162; 3,791,932; 3,817,837; and 4,233,402.

Any of the previously described antagonist anti-CD40 antibodies or antibody fragments thereof may be conjugated prior to use in the methods of the present invention. Methods for producing conjugated antibodies are known in the art. Thus, the anti-CD40 antibody may be labeled using an indirect labeling or indirect labeling approach. By "indirect labeling" or "indirect labeling approach" is intended that a chelating agent is covalently attached to an antibody and at least one radionuclide is inserted into the chelating agent. See, for example, the chelating agents and radionuclides described in Srivagtava and Mease (1991) *Nucl. Med. Bio.* 18:589-603, herein incorporated by reference. Suitable labels include fluorophores, chromophores, radioactive atoms (particularly ^{32}P and ^{125}I), electron-dense reagents, enzymes, and ligands having specific binding partners. Enzymes are typically detected by their activity. For example, horseradish peroxidase is usually detected by its ability to convert 3,3 ',5,5 '-tetramethylbenzidine (TMB) to a blue pigment, quantifiable with a spectrophotometer. "Specific binding partner" refers to a protein capable of binding a ligand molecule with high specificity, as for example in the case of an antigen and a monoclonal antibody specific therefore. Other specific binding partners include biotin and avidin or streptavidin, Ig G and protein A, and the numerous receptor-ligand couples known in the art. It should be understood that the above description is not meant to categorize the various labels into distinct classes, as the same label may serve in several different modes. For example, ^{125}I may serve as a radioactive label or as an electron-dense reagent. HRP may serve as enzyme or as antigen for a mAb. Further, one may combine various labels for desired effect. For example, mAbs and avidin also require labels in the practice of this invention: thus, one might label a mAb with biotin, and detect its presence with avidin labeled with ^{125}I, or with an anti-biotin mAb labeled with HRP. Other

permutations and possibilities will be readily apparent to those of ordinary skill in the art, and are considered as equivalents within the scope of the instant invention.

Alternatively, the anti-CD40 antibody may be labeled using "direct labeling" or a "direct labeling approach," where a radionuclide is covalently attached directly to an antibody (typically via an amino acid residue). Preferred radionuclides are provided in Srivagtava and Mease (1991) *supra*. The indirect labeling approach is particularly preferred. See also, for example, International Publication Nos. WO 00/52031 and WO 00/52473, where a linker is used to attach a radioactive label to antibodies; and the labeled forms of anti-CD40 antibodies described in U.S. Patent No. 6,015,542; herein incorporated by reference.

Further, an antibody (or fragment thereof) may be conjugated to a therapeutic moiety such as a cytotoxin, a therapeutic agent, or a radioactive metal ion or radioisotope. A cytotoxin or cytotoxic agent includes any agent that is detrimental to cells. Examples include taxol, cytochalasin B, gramicidin D, ethidium bromide, emetine, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicin, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthracin dione, mitoxantrone, mithramycin, actinomycin D, 1-dehydrotestosterone, glucocorticoids, procaine, tetracaine, lidocaine, propranolol, and puromycin and analogs or homologs thereof. Therapeutic agents include, but are not limited to, antimetabolites (e.g., methotrexate, 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, cytarabine, 5-fluorouracil decarbazine), alkylating agents (e.g., mechlorethamine, thioepa chlorambucil, melphalan, carmustine (BSNU) and lomustine (CCNU), cyclophosphamide, busulfan, dibromomannitol, streptozotocin, mitomycin C, and cis-dichlorodiamine platinum (II) (DDP) cisplatin), anthracyclines (e.g., daunorubicin (formerly daunomycin) and doxorubicin), antibiotics (e.g., dactinomycin (formerly actinomycin), bleomycin, mithramycin, and anthramycin (AMC)), and anti-mitotic agents (e.g., vincristine and vinblastine). Radioisotopes include, but are not limited to, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, Bi-213, Pd-109, Tc-99, In-111, and the like. The conjugates of the invention can be used for modifying a given biological response; the drug moiety is not to be construed as limited to classical chemical therapeutic agents. For example, the drug moiety may be a protein or polypeptide possessing a desired biological activity. Such proteins may include, for

example, a toxin such as abrin, ricin A, pseudomonas exotoxin, or diphtheria toxin; a protein such as tumor necrosis factor, interferon-alpha, interferon-beta, nerve growth factor, platelet derived growth factor, tissue plasminogen activator; or, biological response modifiers such as, for example, lymphokines, interleukin-1 ("IL-1"), interleukin-2 ("IL-2"), interleukin-6 ("IL-6"), granulocyte macrophage colony stimulating factor ("GM-CSF"), granulocyte colony stimulating factor ("G-CSF"), or other growth factors.

Techniques for conjugating such therapeutic moiety to antibodies are well known. See, for example, Arnon *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; ed. 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.

Alternatively, an antibody can be conjugated to a second antibody to form an antibody heteroconjugate as described in U.S. Patent No. 4,676,980. In addition, linkers may be used between the labels and the antibodies of the invention (see U.S. Patent No. 4,831,175). Antibodies or, antigen-binding fragments thereof may be directly labeled with radioactive iodine, indium, yttrium, or other radioactive particle known in the art (U.S. Patent No. 5,595,721). Treatment may consist of a combination of treatment with conjugated and nonconjugated antibodies administered simultaneously or subsequently (WO 00/52031 and WO 00/52473).

Variants of Antagonist Anti-CD40 Antibodies

Suitable biologically active variants of the antagonist anti-CD40 antibodies can be used in the methods of the present invention. Such variants will retain the desired

binding properties of the parent antagonist anti-CD40 antibody. Methods for making antibody variants are generally available in the art.

For example, amino acid sequence variants of an antagonist anti-CD40 antibody, for example, the CHIR-5.9 or CHIR-12.12 monoclonal antibody described herein; can be prepared by mutations in the cloned DNA sequence encoding the antibody of interest. Methods for mutagenesis and nucleotide sequence alterations are well known in the art. See, for example, Walker and 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); U.S. Patent No. 4,873,192; and the references cited therein; herein incorporated by reference. Guidance as to appropriate amino acid substitutions that do not affect biological activity of the polypeptide of interest may be found in the model of Dayhoff *et al.* (1978) in *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), herein incorporated by reference. Conservative substitutions, such as exchanging one amino acid with another having similar properties, may be preferred. Examples of conservative substitutions include, but are not limited to, Gly⇔Ala, Val⇔Ile⇔Leu, Asp⇔Glu, Lys⇔Arg, Asn⇔Gln, and Phe⇔Trp⇔Tyr.

In constructing variants of the antagonist anti-CD40 antibody polypeptide of interest, modifications are made such that variants continue to possess the desired activity, i.e., similar binding affinity and are capable of specifically binding to a human CD40 antigen expressed on the surface of a human cell, and being free of significant agonist activity but exhibiting antagonist activity when bound to a CD40 antigen on a human CD40-expressing cell. Obviously, any mutations made in the DNA encoding the variant polypeptide must not place the sequence out of reading frame and preferably will not create complementary regions that could produce secondary mRNA structure. See EP Patent Application Publication No. 75,444.

In addition, the constant region of an antagonist anti-CD40 antibody can be mutated to alter effector function in a number of ways. For example, see U.S. Patent No. 6,737,056B1 and U.S. Patent Application Publication No. 2004/0132101A1, which disclose Fc mutations that optimize antibody binding to Fc receptors.

Preferably, variants of a reference antagonist anti-CD40 antibody have amino acid sequences that have at least 70% or 75% sequence identity, preferably at least 80% or 85% sequence identity, more preferably at least 90%, 91%, 92%, 93%, 94% or 95% sequence identity to the amino acid sequence for the reference antagonist anti-CD40 antibody molecule, for example, the CHIR-5.9 or CHIR-12.12 monoclonal antibody described herein, or to a shorter portion of the reference antibody molecule. More preferably, the molecules share at least 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity. For purposes of the present invention, percent sequence identity is determined using the Smith-Waterman homology search algorithm using an affine gap search with a gap open penalty of 12 and a gap extension penalty of 2, BLOSUM matrix of 62. The Smith-Waterman homology search algorithm is taught in Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482-489. A variant may, for example, differ from the reference antagonist anti-CD40 antibody by as few as 1 to 15 amino acid residues, as few as 1 to 10 amino acid residues, such as 6-10, as few as 5, as few as 4, 3, 2, or even 1 amino acid residue.

With respect to optimal alignment of two amino acid sequences, the contiguous segment of the variant amino acid sequence may have additional amino acid residues or deleted amino acid residues with respect to the reference amino acid sequence. The contiguous segment used for comparison to the reference amino acid sequence will include at least 20 contiguous amino acid residues, and may be 30, 40, 50, or more amino acid residues. Corrections for sequence identity associated with conservative residue substitutions or gaps can be made (see Smith-Waterman homology search algorithm).

The precise chemical structure of a polypeptide capable of specifically binding CD40 and retaining antagonist activity, particularly when bound to CD40 antigen on malignant B cells, depends on a number of factors. As ionizable amino and carboxyl groups are present in the molecule, a particular polypeptide may be obtained as an acidic or basic salt, or in neutral form. All such preparations that retain their biological activity when placed in suitable environmental conditions are included in the definition of antagonist anti-CD40 antibodies as used herein. Further, the primary amino acid sequence of the polypeptide may be augmented by derivatization using sugar moieties (glycosylation) or by other supplementary molecules such as lipids, phosphate, acetyl groups and the like. It may also be augmented by conjugation with saccharides. Certain

aspects of such augmentation are accomplished through post-translational processing systems of the producing host; other such modifications may be introduced *in vitro*. In any event, such modifications are included in the definition of an anti-CD40 antibody used herein so long as the antagonist properties of the anti-CD40 antibody are not destroyed. It is expected that such modifications may quantitatively or qualitatively affect the activity, either by enhancing or diminishing the activity of the polypeptide, in the various assays. Further, individual amino acid residues in the chain may be modified by oxidation, reduction, or other derivatization, and the polypeptide may be cleaved to obtain fragments that retain activity. Such alterations that do not destroy antagonist activity do not remove the polypeptide sequence from the definition of anti-CD40 antibodies of interest as used herein.

The art provides substantial guidance regarding the preparation and use of polypeptide variants. In preparing the anti-CD40 antibody variants, one of skill in the art can readily determine which modifications to the native protein nucleotide or amino acid sequence will result in a variant that is suitable for use as a therapeutically active component of a pharmaceutical composition used in the methods of the present invention.

Methods of Therapy Using the Antagonist Anti-CD40 Antibodies of the Invention

Methods of the invention are directed to the use of antagonist anti-CD40 antibodies to treat patients having a disease mediated by stimulation of CD40 signaling on CD40-expressing cells. By "CD40-expressing cell" is intended normal and malignant B cells expressing CD40 antigen. Methods for detecting CD40 expression in cells are well known in the art and include, but are not limited to, PCR techniques, immunohistochemistry, flow cytometry, Western blot, ELISA, and the like. By "malignant" B cell is intended any neoplastic B cell, including but not limited to B cells derived from lymphomas including low-, intermediate-, and high-grade B cell lymphomas, immunoblastic lymphomas, non-Hodgkin's lymphomas, Hodgkin's disease, Epstein-Barr Virus (EBV) induced lymphomas, and AIDS-related lymphomas, as well as B cell acute lymphoblastic leukemias, myelomas, chronic lymphocytic leukemias, acute myeloblastic leukemias, and the like.

"Treatment" is herein defined as the application or administration of an antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof to a patient, or application or administration of an antagonist anti-CD40 antibody or fragment thereof to an isolated tissue or cell line from a patient, where the patient has a disease, a symptom of a disease, or a predisposition toward a disease, where the purpose is to cure, heal, alleviate, relieve, alter, remedy, ameliorate, improve, or affect the disease, the symptoms of the disease, or the predisposition toward the disease. By "treatment" is also intended the application or administration of a pharmaceutical composition comprising the antagonist anti-CD40 antibodies or fragments thereof to a patient, or application or administration of a pharmaceutical composition comprising the anti-CD40 antibodies or fragments thereof to an isolated tissue or cell line from a patient, who has a disease, a symptom of a disease, or a predisposition toward a disease, where the purpose is to cure, heal, alleviate, relieve, alter, remedy, ameliorate, improve, or affect the disease, the symptoms of the disease, or the predisposition toward the disease.

By "anti-tumor activity" is intended a reduction in the rate of malignant CD40-expressing cell proliferation or accumulation, and hence a decline in growth rate of an existing tumor or in a tumor that arises during therapy, and/or destruction of existing neoplastic (tumor) cells or newly formed neoplastic cells, and hence a decrease in the overall size of a tumor during therapy. Therapy with at least one anti-CD40 antibody (or antigen-binding fragment thereof) causes a physiological response that is beneficial with respect to treatment of disease states associated with stimulation of CD40 signaling on CD40-expressing cells in a human.

The methods of the invention find use in the treatment of non-Hodgkin's lymphomas related to abnormal, uncontrollable B cell proliferation or accumulation. For purposes of the present invention, such lymphomas will be referred to according to the *Working Formulation* classification scheme, that is those B cell lymphomas categorized as low grade, intermediate grade, and high grade (see "The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project," *Cancer* 49(1982):2112-2135). Thus, low-grade B cell lymphomas include small lymphocytic, follicular small-cleaved cell, and follicular mixed small-cleaved and large cell lymphomas; intermediate-grade lymphomas include follicular large cell, diffuse small cleaved cell, diffuse mixed small and large cell, and

diffuse large cell lymphomas; and high-grade lymphomas include large cell immunoblastic, lymphoblastic, and small non-cleaved cell lymphomas of the Burkitt's and non-Burkitt's type.

It is recognized that the methods of the invention are useful in the therapeutic treatment of B cell lymphomas that are classified according to the Revised European and American Lymphoma Classification (REAL) system. Such B cell lymphomas include, but are not limited to, lymphomas classified as precursor B cell neoplasms, such as B lymphoblastic leukemia/lymphoma; peripheral B cell neoplasms, including B cell chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma, lymphoplasmacytoid lymphoma/immunocytoma, mantle cell lymphoma (MCL), follicle center lymphoma (follicular) (including diffuse small cell, diffuse mixed small and large cell, and diffuse large cell lymphomas), marginal zone B cell lymphoma (including extranodal, nodal, and splenic types), hairy cell leukemia, plasmacytoma/ myeloma, diffuse large cell B cell lymphoma of the subtype primary mediastinal (thymic), Burkitt's lymphoma, and Burkitt's like high grade B cell lymphoma; acute leukemias; acute lymphocytic leukemias; myeloblastic leukemias; acute myelocytic leukemias; promyelocytic leukemia; myelomonocytic leukemia; monocytic leukemia; erythroleukemia; granulocytic leukemia (chronic myelocytic leukemia); chronic lymphocytic leukemia; polycythemia vera; multiple myeloma; Waldenstrom's macroglobulinemia; heavy chain disease; and unclassifiable low-grade or high-grade B cell lymphomas.

It is recognized that the methods of the invention may be useful in preventing further tumor outgrowths arising during therapy. The methods of the invention are particularly useful in the treatment of subjects having low-grade B cell lymphomas, particularly those subjects having relapses following standard chemotherapy. Low-grade B cell lymphomas are more indolent than the intermediate- and high-grade B cell lymphomas and are characterized by a relapsing/remitting course. Thus, treatment of these lymphomas is improved using the methods of the invention, as relapse episodes are reduced in number and severity.

The antagonist anti-CD40 antibodies described herein may also find use in the treatment of inflammatory diseases and deficiencies or disorders of the immune system including, but not limited to, systemic lupus erythematosus, psoriasis, scleroderma,

CREST syndrome, inflammatory myositis, Sjogren's syndrome, mixed connective tissue disease, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, inflammatory bowel disease, acute respiratory distress syndrome, pulmonary inflammation, idiopathic pulmonary fibrosis, osteoporosis, delayed type hypersensitivity, asthma, primary biliary cirrhosis, and idiopathic thrombocytopenic purpura.

In accordance with the methods of the present invention, at least one antagonist anti-CD40 antibody (or antigen-binding fragment thereof) as defined elsewhere herein is used to promote a positive therapeutic response with respect to a malignant human B cell. By "positive therapeutic response" with respect to cancer treatment is intended an improvement in the disease in association with the anti-tumor activity of these antibodies or fragments thereof, and/or an improvement in the symptoms associated with the disease. That is, an anti-proliferative effect, the prevention of further tumor outgrowths, a reduction in tumor size, a reduction in the number of cancer cells, and/or a decrease in one or more symptoms mediated by stimulation of CD40-expressing cells can be observed. Thus, for example, an improvement in the disease may be characterized as a complete response. By "complete response" is intended an absence of clinically detectable disease with normalization of any previously abnormal radiographic studies, bone marrow, and cerebrospinal fluid (CSF). Such a response must persist for at least one month following treatment according to the methods of the invention. Alternatively, an improvement in the disease may be categorized as being a partial response. By "partial response" is intended at least about a 50% decrease in all measurable tumor burden (i.e., the number of tumor cells present in the subject) in the absence of new lesions and persisting for at least one month. Such a response is applicable to measurable tumors only.

Tumor response can be assessed for changes in tumor morphology (i.e., overall tumor burden, tumor size, and the like) using screening techniques such as magnetic resonance imaging (MRI) scan, x-radiographic imaging, computed tomographic (CT) scan, bioluminescent imaging, for example, luciferase imaging, bone scan imaging, and tumor biopsy sampling including bone marrow aspiration (BMA). In addition to these positive therapeutic responses, the subject undergoing therapy with the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof may experience the beneficial effect

of an improvement in the symptoms associated with the disease. Thus for B cell tumors, the subject may experience a decrease in the so-called B symptoms, i.e., night sweats, fever, weight loss, and/or urticaria.

By "therapeutically effective dose or amount" or "effective amount" is intended an amount of antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof that, when administered brings about a positive therapeutic response with respect to treatment of a patient with a disease comprising stimulation of CD40-expressing cells. In some embodiments of the invention, a therapeutically effective dose of the anti-CD40 antibody or fragment thereof is in the range from about 0.01 mg/kg to about 40 mg/kg, from about 0.01 mg/kg to about 30 mg/kg, from about 0.1 mg/kg to about 30 mg/kg, from about 1 mg/kg to about 30 mg/kg, from about 3 mg/kg to about 30 mg/kg, from about 3 mg/kg to about 25 mg/kg, from about 3 mg/kg to about 20 mg/kg, from about 5 mg/kg to about 15 mg/kg, or from about 7 mg/kg to about 12 mg/kg. It is recognized that the method of treatment may comprise a single administration of a therapeutically effective dose or multiple administrations of a therapeutically effective dose of the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof.

A further embodiment of the invention is the use of antagonist anti-CD40 antibodies for diagnostic monitoring of protein levels in tissue as part of a clinical testing procedure, e.g., to determine the efficacy of a given treatment regimen. Detection can be facilitated by coupling the antibody to a detectable substance. Examples of detectable substances include various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials, bioluminescent materials, and radioactive materials. Examples of suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, β-galactosidase, or acetylcholinesterase; examples of suitable prosthetic group complexes include streptavidin/biotin and avidin/biotin; examples of suitable fluorescent materials include umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride or phycoerythrin; an example of a luminescent material includes luminol; examples of bioluminescent materials include luciferase, luciferin, and aequorin; and examples of suitable radioactive material include ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S, or ^{3}H.

The anti-CD40 antibodies described herein can further be used to provide reagents, e.g., labeled antibodies that can be used, for example, to identify cells

expressing CD40. This can be very useful in determining the cell type of an unknown sample. Panels of monoclonal antibodies can be used to identify tissue by species and/or by organ type. In a similar fashion, these anti-CD40 antibodies can be used to screen tissue culture cells for contamination (i.e., screen for the presence of a mixture of CD40-expressing and non-CD40 expressing cells in a culture).

The antagonist anti-CD40 antibodies can be used in combination with known chemotherapeutics and cytokines for the treatment of disease states comprising stimulated CD40-expressing cells. For example, the anti-CD40 antibodies of the invention can be used in combination with cytokines such as interleukin-2. In another embodiment, the anti-CD40 antibodies of the invention can be used in combination with rituximab (IDEC-C2B8; Rituxan®; IDEC Pharmaceuticals Corp., San Diego, California).

In this manner, the antagonist anti-CD40 antibodies described herein, or antigen-binding fragments thereof, are administered in combination with at least one other cancer therapy, including, but not limited to, surgery or surgical procedures (e.g. splenectomy, hepatectomy, lymphadenectomy, leukophoresis, bone marrow transplantation, and the like); radiation therapy; chemotherapy, optionally in combination with autologous bone marrow transplant, where suitable chemotherapeutic agents include, but are not limited to, fludarabine or fludarabine phosphate, chlorambucil, vincristine, pentostatin, 2-chlorodeoxyadenosine (cladribine), cyclophosphamide, doxorubicin, prednisone, and combinations thereof, for example, anthracycline-containing regimens such as CAP (cyclophosphamide, doxorubicin plus prednisone), CHOP (cyclophosphamide, vincristine, prednisone plus doxorubicin), VAD (vincritsine, doxorubicin, plus dexamethasone), MP (melphalan plus prednisone), and other cytotoxic and/or therapeutic agents used in chemotherapy such as mitoxantrone, daunorubicin, idarubicin, asparaginase, and antimetabolites, including, but not limited to, cytarabine, methotrexate, 5-fluorouracil decarbazine, 6-thioguanine, 6-mercaptopurine, and nelarabine; other anti-cancer monoclonal antibody therapy (for example, alemtuzumab (Campath®) or other anti-CD52 antibody targeting the CD52 cell-surface glycoprotein on malignant B cells; rituximab (Rituxan®), the fully human antibody HuMax-CD20, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar®), ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), or any other therapeutic anti-CD20 antibody targeting the CD20 antigen on

malignant B cells; anti-CD19 antibody (for example, MT103, a bispecific antibody); anti-CD22 antibody (for example, the humanized monoclonal antibody epratuzumab); bevacizumab (Avastin®) or other anti-cancer antibody targeting human vascular endothelial growth factor; anti-CD22 antibody targeting the CD22 antigen on malignant B cells (for example, the monoclonal antibody BL-22, an alphaCD22 toxin); α-M-CSF antibody targeting macrophage colony stimulating factor; antibodies targeting the receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK) and its ligand (RANKL), which are overexpressed in multiple myeloma; anti-CD23 antibody targeting the CD23 antigen on malignant B cells (for example, IDEC-152); anti-CD80 antibody targeting the CD80 antigen (for example, IDEC-114); anti-CD38 antibody targeting the CD38 antigen on malignant B cells; antibodies targeting major histocompatibility complex class II receptors (anti-MHC antibodies) expressed on malignant B cells; other anti-CD40 antibodies (for example, SGN-40) targeting the CD40 antigen on malignant B cells; and antibodies targeting tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) (for example, the agonistic human monoclonal antibody HGS-ETR1) and TRAIL-R2 expressed on a number of solid tumors and tumors of hematopoietic origin); small molecule-based cancer therapy, including, but not limited to, microtubule and/or topoisomerase inhibitors (for example, the mitotic inhibitor dolastatin and dolastatin analogues; the tubulin-binding agent T900607; XL119; and the topoisomerase inhibitor aminocamptothecin), SDX-105 (bendamustine hydrochloride), ixabepilone (an epothilone analog, also referred to as BMS-247550), protein kinase C inhibitors, for example, midostaurin ((PKC-412, CGP 41251, N-benzoylstaurosporine), pixantrone, eloxatin (an antineoplastic agent), ganite (gallium nitrate), Thalomid® (thalidomide), immunomodulatory derivatives of thalidomide (for example, revlimid (formerly revimid)), Affinitak™ (antisense inhibitor of protein kinase C-alpha), SDX-101 (R-etodolac, inducing apoptosis of malignant lymphocytes), second-generation purine nucleoside analogs such as clofarabine, inhibitors of production of the protein Bcl-2 by cancer cells (for example, the antisense agents oblimersen and Genasense®), proteasome inhibitors (for example, Velcade™ (bortezomib)), small molecule kinase inhibitors (for example, CHIR-258), small molecule VEGF inhibitors (for example, ZD-6474), small molecule inhibitors of heat shock protein (HSP) 90 (for example, 17-AAG), small

molecule inhibitors of histone deacetylases (for example, hybrid/polar cytodifferentiation HPC) agents such as suberanilohydroxamic acid (SAHA), and FR-901228) and apoptotic agents such as Trisenox® (arsenic trioxide) and Xcytrin® (motexafin gadolinium); vaccine /immunotherapy-based cancer therapies, including, but not limited to, vaccine approaches (for example, Id-KLH, oncophage, vitalethine), personalized immunotherapy or active idiotype immunotherapy (for example, MyVax® Personalized Immunotherapy, formally designated GTOP-99), Promune® (CpG 7909, a synthetic agonist for toll-like receptor 9 (TLR9)), interferon-alpha therapy, interleukin-2 (IL-2) therapy, IL-12 therapy, IL-15 therapy, and IL-21 therapy; steroid therapy; or other cancer therapy; where the additional cancer therapy is administered prior to, during, or subsequent to the antagonist anti-CD40 antibody therapy. Thus, where the combined therapies comprise administration of an antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof in combination with administration of another therapeutic agent, as with chemotherapy, radiation therapy, other anti-cancer antibody therapy, small molecule-based cancer therapy, or vaccine/immunotherapy-based cancer therapy, the methods of the invention encompass coadministration, using separate formulations or a single pharmaceutical formulation, or and consecutive administration in either order. Where the methods of the present invention comprise combined therapeutic regimens, these therapies can be given simultaneously, i.e., the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof is administered concurrently or within the same time frame as the other cancer therapy (i.e., the therapies are going on concurrently, but the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof is not administered precisely at the same time as the other cancer therapy). Alternatively, the antagonist anti-CD40 antibody of the present invention or antigen-binding fragment thereof may also be administered prior to or subsequent to the other cancer therapy. Sequential administration of the different cancer therapies may be performed regardless of whether the treated subject responds to the first course of therapy to decrease the possibility of remission or relapse. Where the combined therapies comprise administration of the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof in combination with administration of a cytotoxic agent, preferably the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof is administered prior to administering the cytotoxic agent.

In some embodiments of the invention, the antagonist anti-CD40 antibodies described herein, or antigen-binding fragments thereof, are administered in combination with chemotherapy, and optionally in combination with autologous bone marrow transplantation, wherein the antibody and the chemotherapeutic agent(s) may be administered sequentially, in either order, or simultaneously (i.e., concurrently or within the same time frame). Examples of suitable chemotherapeutic agents include, but are not limited to, fludarabine or fludarabine phosphate, chlorambucil, vincristine, pentostatin, 2-chlorodeoxyadenosine (cladribine), cyclophosphamide, doxorubicin, prednisone, and combinations thereof, for example, anthracycline-containing regimens such as CAP (cyclophosphamide, doxorubicin plus prednisone), CHOP (cyclophosphamide, vincristine, prednisone plus doxorubicin), VAD (vincritsine, doxorubicin, plus dexamethasone), MP (melphalan plus prednisone), and other cytotoxic and/or therapeutic agents used in chemotherapy such as mitoxantrone, daunorubicin, idarubicin, asparaginase, and antimetabolites, including, but not limited to, cytarabine, methotrexate, 5-fluorouracil decarbazine, 6-thioguanine, 6-mercaptopurine, and nelarabine. In some embodiments, the antagonist anti-CD40 antibody, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or an antigen-binding fragment thereof is administered prior to treatment with the chemotherapeutic agent. In alternative embodiments, the antagonist anti-CD40 antibody is administered after treatment with the chemotherapeutic agent. In yet other embodiments, the chemotherapeutic agent is administered simultaneously with the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof.

Thus, for example, in some embodiments, the antagonist anti-CD40 antibody, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding fragment thereof is administered in combination with fludarabine or fludarabine phosphate. In one such embodiment, the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof is administered prior to administration of fludarabine or fludarabine phosphate. In alternative embodiments, the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof is administered after treatment with fludarabine or fludarabine phosphate. In yet other embodiments, the fludarabine or fludarabine phosphate is administered simultaneously with the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof.

In other embodiments of the invention, chlorambucil, an alkylating drug, is administered in combination with an antagonist anti-CD40 antibody described herein, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or an antigen-binding fragment thereof. In one such embodiment, the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof is administered prior to administration of chlorambucil. In alternative embodiments, the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof is administered after treatment with chlorambucil. In yet other embodiments, the chlorambucil is administered simultaneously with the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof.

In yet other embodiments, anthracycline-containing regimens such as CAP (cyclophosphamide; doxorubicin plus prednisone) and CHOP (cyclophosphamide, vincristine, prednisone plus doxorubicin) may be combined with administration of an antagonist anti-CD40 antibody described herein, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding fragment thereof. In one such embodiment, the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof is administered prior to administration of anthracycline-containing regimens. In other embodiments, the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof is administered after treatment with anthracycline-containing regimens. In yet other embodiments, the anthracycline-containing regimen is administered simultaneously with the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof.

In alternative embodiments, an antagonist anti-CD40 antibody described herein, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or an antigen-binding fragment thereof, is administered in combination with alemtuzumab (Campath®; distributed by Berlex Laboratories, Richmond, California). Alemtuzumab is a recombinant humanized monoclonal antibody (Campath-1H) that targets the CD52 antigen expressed on malignant B cells. In one such embodiment, the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof is administered prior to administration of alemtuzumab. In other embodiments, the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof is administered after treatment with alemtuzumab. In yet other embodiments, the alemtuzumab is administered

simultaneously with the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof.

In alternative embodiments, an antagonist anti-CD40 antibody described herein, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding fragment thereof, is administered in combination with a therapeutic anti-CD20 antibody targeting the CD20 antigen on malignant B cells, for example, rituximab (Rituxan®), the fully human antibody HuMax-CD20, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar®), or ibritumomab tiuxetan (Zevalin®). In one such embodiment, the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof is administered prior to administration of the anti-CD20 antibody. In other embodiments, the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof is administered after treatment with the anti-CD20 antibody. In yet other embodiments, the anti-CD20 antibody is administered simultaneously with the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof.

In alternative embodiments, an antagonist anti-CD40 antibody described herein, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding fragment thereof, is administered in combination with a small molecule-based cancer therapy, including, but not limited to, microtubule and/or topoisomerase inhibitors (for example, the mitotic inhibitor dolastatin and dolastatin analogues; the tubulin-binding agent T900607; XL119; and the topoisomerase inhibitor aminocamptothecin), SDX-105 (bendamustine hydrochloride), ixabepilone (an epothilone analog, also referred to as BMS-247550), protein kinase C inhibitors, for example, midostaurin ((PKC-412, CGP 41251, N-benzoylstaurosporine), pixantrone, eloxatin (an antineoplastic agent), ganite (gallium nitrate), Thalomid® (thalidomide), immunomodulatory derivatives of thalidomide (for example, revlimid (formerly revimid)), Affinitak™ (antisense inhibitor of protein kinase C-alpha), SDX-101 (R-etodolac, inducing apoptosis of malignant lymphocytes), second-generation purine nucleoside analogs such as clofarabine, inhibitors of production of the protein Bcl-2 by cancer cells (for example, the antisense agents oblimersen and Genasense®), proteasome inhibitors (for example, Velcade™ (bortezomib)), small molecule kinase inhibitors (for example, CHIR-258), small molecule VEGF inhibitors (for example, ZD-6474), small molecule inhibitors of heat

shock protein (HSP) 90 (for example, 17-AAG), small molecule inhibitors of histone deacetylases (for example, hybrid/polar cytodifferentiation HPC) agents such as suberanilohydroxamic acid (SAHA), and FR-901228) and apoptotic agents such as Trisenox® (arsenic trioxide) and Xcytrin® (motexafin gadolinium). In one such embodiment, the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof is administered prior to administration of the small molecule-based cancer therapy. In other embodiments, the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof is administered after treatment with the small molecule-based cancer therapy. In yet other embodiments, the small molecule-based cancer therapy is administered simultaneously with the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof.

In yet other embodiments, an antagonist anti-CD40 antibody described herein, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9 or an antigen-binding fragment thereof, can be used in combination with vaccine/immunotherapy-based cancer therapy, including, but not limited to, vaccine approaches (for example, Id-KLH, oncophage, vitalethine), personalized immunotherapy or active idiotype immunotherapy (for example, MyVax® Personalized Immunotherapy, formally designated GTOP-99), Promune® (CpG 7909, a synthetic agonist for toll-like receptor 9 (TLR9)), interferon-alpha therapy, interleukin-2 (IL-2) therapy, IL-12 therapy, IL-15 therapy, or IL-21 therapy; or steroid therapy. In one such embodiment, the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof is administered prior to administration of the vaccine/immunotherapy-based cancer therapy. In other embodiments, the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof is administered after treatment with the vaccine/immunotherapy-based cancer therapy. In yet other embodiments, the vaccine/immunotherapy-based cancer therapy is administered simultaneously with the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof.

In one such embodiment, an antagonist anti-CD40 antibody described herein, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or an antigen-binding fragment thereof, can be used in combination with IL-2. IL-2, an agent known to expand the number of natural killer (NK) effector cells in treated patients, can be administered prior to, or concomitantly with, the antagonist anti-CD40 antibody of the invention or antigen-binding fragment thereof. This expanded number of NK effector cells may lead

to enhanced ADCC activity of the administered antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof. In other embodiments, IL-21 serves as the immunotherapeutic agent to stimulate NK cell activity when administered in combination with an antagonist anti-CD40 antibody described herein, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or an antigen-binding fragment thereof.

Further, combination therapy with two or more therapeutic agents and an antagonist anti-CD40 antibody described herein can also be used for treatment of a treatment of disease states comprising stimulated CD40-expressing cells, for example, B cell-related cancers, and autoimmune and/or inflammatory disorders. Without being limiting, examples include triple combination therapy, where two chemotherapeutic agents are administered in combination with an antagonist anti-CD40 antibody described herein, and where a chemotherapeutic agent and another anti-cancer monoclonal antibody (for example, alemtuzumab, rituximab, or anti-CD23 antibody) are administered in combination with an antagonist anti-CD40 antibody described herein. Examples of such combinations include, but are not limited to, combinations of fludarabine, cyclophosphamide, and the antagonist anti-CD40 antibody, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9 or an antigen-binding fragment thereof; and combinations of fludarabine, an anti-CD20 antibody, for example, rituximab (Rituxan®; IDEC Pharmaceuticals Corp., San Diego, California), and the antagonist anti-CD40 antibody, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9 or an antigen-binding fragment thereof.

Pharmaceutical Formulations and Modes of Administration

The antagonist anti-CD40 antibodies of this invention are administered at a concentration that is therapeutically effective to prevent or treat CD40-expressing cell-mediated diseases such as SLE, PBC, ITP, multiple sclerosis, psoriasis, Crohn's disease, graft rejection, and B-cell lymphoma. To accomplish this goal, the antibodies may be formulated using a variety of acceptable excipients known in the art. Typically, the antibodies are administered by injection, either intravenously or intraperitoneally. Methods to accomplish this administration are known to those of ordinary skill in the art.

It may also be possible to obtain compositions which may be topically or orally administered, or which may be capable of transmission across mucous membranes.

Intravenous administration occurs preferably by infusion over a period of about 1 to about 10 hours, more preferably over about 1 to about 8 hours, even more preferably over about 2 to about 7 hours, still more preferably over about 4 to about 6 hours, depending upon the anti-CD40 antibody being administered. The initial infusion with the pharmaceutical composition may be given over a period of about 4 to about 6 hours with subsequent infusions delivered more quickly. Subsequent infusions may be administered over a period of about 1 to about 6 hours, including, for example, about 1 to about 4 hours, about 1 to about 3 hours, or about 1 to about 2 hours.

A pharmaceutical composition of the invention is formulated to be compatible with its intended route of administration. Examples of possible routes of administration include parenteral, (e.g., intravenous (IV), intramuscular (IM), intradermal, subcutaneous (SC), or infusion), oral and pulmonary (e.g., inhalation), nasal, transdermal (topical), transmucosal, and rectal administration. Solutions or suspensions used for parenteral, intradermal, or subcutaneous application can include the following components: a sterile diluent such as water for injection, saline solution, fixed oils, polyethylene glycols, glycerin, propylene glycol or other synthetic solvents; antibacterial agents such as benzyl alcohol or methyl parabens; antioxidants such as ascorbic acid or sodium bisulfite; chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid; buffers such as acetates, citrates or phosphates and agents for the adjustment of tonicity such as sodium chloride or dextrose. pH can be adjusted with acids or bases, such as hydrochloric acid or sodium hydroxide. The parenteral preparation can be enclosed in ampoules, disposable syringes, or multiple dose vials made of glass or plastic.

The anti-CD40 antibodies are typically provided by standard technique within a pharmaceutically acceptable buffer, for example, sterile saline, sterile buffered water, propylene glycol, combinations of the foregoing, etc. Methods for preparing parenterally administrable agents are described in *Remington's Pharmaceutical Sciences* (18th ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990), herein incorporated by reference. See also, for example, WO 98/56418, which describes stabilized antibody pharmaceutical formulations suitable for use in the methods of the present invention.

The amount of at least one anti-CD40 antibody or fragment thereof to be administered is readily determined by one of ordinary skill in the art without undue experimentation. Factors influencing the mode of administration and the respective amount of at least one antagonist anti-CD40 antibody (or fragment thereof) include, but are not limited to, the the severity of the disease, the history of the disease, and the age, height, weight, health, and physical condition of the individual undergoing therapy. Similarly, the amount of antagonist anti-CD40 antibody or fragment thereof to be administered will be dependent upon the mode of administration and whether the subject will undergo a single dose or multiple doses of this anti-tumor agent. Generally, a higher dosage of anti-CD40 antibody or fragment thereof is preferred with increasing weight of the subject undergoing therapy. The dose of anti-CD40 antibody or fragment thereof to be administered is in the range from about 0.003 mg/kg to about 50 mg/kg, preferably in the range of 0.01 mg/kg to about 40 mg/kg. Thus, for example, the dose can be 0.01 mg/kg, 0.03 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 1.5 mg/kg, 2 mg/kg, 2.5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, or 50 mg/kg.

In another embodiment of the invention, the method comprises administration of multiple doses of antagonist anti-CD40 antibody or fragment thereof. The method may comprise administration of 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, or more therapeutically effective doses of a pharmaceutical composition comprising an antagonist anti-CD40 antibody or fragment thereof. The frequency and duration of administration of multiple doses of the pharmaceutical compositions comprising anti-CD40 antibody or fragment thereof can be readily determined by one of skill in the art without undue experimentation. Moreover, treatment of a subject with a therapeutically effective amount of an antibody can include a single treatment or, preferably, can include a series of treatments. In a preferred example, a subject is treated with antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof in the range of between about 0.1 to 20 mg/kg body weight, once per week for between about 1 to 10 weeks, preferably between about 2 to 8 weeks, more preferably between about 3 to 7 weeks, and even more preferably for about 4, 5, or 6 weeks. Treatment may occur annually to prevent relapse or upon indication of relapse. It will also be appreciated that the effective dosage of

antibody or antigen-binding fragment thereof used for treatment may increase or decrease over the course of a particular treatment. Changes in dosage may result and become apparent from the results of diagnostic assays as described herein.

Thus, in one embodiment, the dosing regimen includes a first administration of a therapeutically effective dose of at least one anti-CD40 antibody or fragment thereof on days 1, 7, 14, and 21 of a treatment period. In another embodiment, the dosing regimen includes a first administration of a therapeutically effective dose of at least one anti-CD40 antibody or fragment thereof on days 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 of a week in a treatment period. Further embodiments include a dosing regimen having a first administration of a therapeutically effective dose of at least one anti-CD40 antibody or fragment thereof on days 1, 3, 5, and 7 of a week in a treatment period; a dosing regimen including a first administration of a therapeutically effective dose of at least one anti-CD40 antibody or fragment thereof on days 1 and 3 of a week in a treatment period; and a preferred dosing regimen including a first administration of a therapeutically effective dose of at least one anti-CD40 antibody or fragment thereof on day 1 of a week in a treatment period. The treatment period may comprise 1 week, 2 weeks, 3 weeks, a month, 3 months, 6 months, or a year. Treatment periods may be subsequent or separated from each other by a day, a week, 2 weeks, a month, 3 months, 6 months, or a year.

In some embodiments, the therapeutically effective doses of antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof ranges from about 0.003 mg/kg to about 50 mg/kg, from about 0.01 mg/kg to about 40 mg/kg, from about 0.01 mg/kg to about 30 mg/kg, from about 0.1 mg/kg to about 30 mg/kg, from about 0.5 mg/kg to about 30 mg/kg, from about 1 mg/kg to about 30 mg/kg, from about 3 mg/kg to about 30 mg/kg, from about 3 mg/kg to about 25 mg/kg, from about 3 mg/kg to about 20 mg/kg, from about 5 mg/kg to about 15 mg/kg, or from about 7 mg/kg to about 12 mg/kg. Thus, for example, the dose of any one antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof, for example the anti-CD40 monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9 or antigen-binding fragment thereof, can be 0.003 mg/kg, 0.01 mg/kg, 0.03 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 1.5 mg/kg, 2 mg/kg, 2.5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, or other such doses falling within the range of about 0.003

mg/kg to about 50 mg/kg. The same therapeutically effective dose of an antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof can be administered throughout each week of antibody dosing. Alternatively, different therapeutically effective doses of an antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof can be used over the course of a treatment period.

In other embodiments, the initial therapeutically effective dose of an antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof as defined elsewhere herein can be in the lower dosing range (i.e., about 0.003 mg/kg to about 20 mg/kg) with subsequent doses falling within the higher dosing range (i.e., from about 20 mg/kg to about 50 mg/kg).

In alternative embodiments, the initial therapeutically effective dose of an antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof as defined elsewhere herein can be in the upper dosing range (i.e., about 20 mg/kg to about 50 mg/kg) with subsequent doses falling within the lower dosing range (i.e., 0.003 mg/kg to about 20 mg/kg). Thus, in one embodiment, the initial therapeutically effective dose of the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof is about 20 mg/kg to about 35 mg/kg, including about 20 mg/kg, about 25 mg/kg, about 30 mg/kg, and about 35 mg/kg, and subsequent therapeutically effective doses of the antagonist anti-CD40 antibody or antigen binding fragment thereof are about 5 mg/kg to about 15 mg/kg, including about 5 mg/kg, 8 mg/kg, 10 mg/kg, 12 mg/kg, and about 15 mg/kg.

In some embodiments of the invention, antagonist anti-CD40 antibody therapy is initiated by administering a "loading dose" of the antibody or antigen-binding fragment thereof to the subject in need of antagonist anti-CD40 antibody therapy. By "loading dose" is intended an initial dose of the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof that is administered to the subject, where the dose of the antibody or antigen-binding fragment thereof administered falls within the higher dosing range (i.e., from about 20 mg/kg to about 50 mg/kg). The "loading dose" can be administered as a single administration, for example, a single infusion where the antibody or antigen-binding fragment thereof is administered IV, or as multiple administrations, for example, multiple infusions where the antibody or antigen-binding fragment thereof is administered IV, so long as the complete "loading dose" is administered within about a

24-hour period. Following administration of the "loading dose," the subject is then administered one or more additional therapeutically effective doses of the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof. Subsequent therapeutically effective doses can be administered, for example, according to a weekly dosing schedule, or once every two weeks, once every three weeks, or once every four weeks. In such embodiments, the subsequent therapeutically effective doses generally fall within the lower dosing range (i.e., 0.003 mg/kg to about 20 mg/kg).

Alternatively, in some embodiments, following the "loading dose, " the subsequent therapeutically effective doses of the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof are administered according to a "maintenance schedule," wherein the therapeutically effective dose of the antibody or antigen-binding fragment thereof is administered once a month, once every 6 weeks, once every two months, once every 10 weeks, once every three months, once every 14 weeks, once every four months, once every 18 weeks, once every five months, once every 22 weeks, once every six months, once every 7 months, once every 8 months, once every 9 months, once every 10 months, once every 11 months, or once every 12 months. In such embodiments, the therapeutically effective doses of the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof fall within the lower dosing range (i.e., 0.003 mg/kg to about 20 mg/kg), particularly when the subsequent doses are administered at more frequent intervals, for example, once every two weeks to once every month, or within the higher dosing range (i.e., from about 20 mg/kg to about 50 mg/kg), particularly when the subsequent doses are administered at less frequent intervals, for example, where subsequent doses are administered about one month to about 12 months apart.

The antagonist anti-CD40 antibodies present in the pharmaceutical compositions described herein for use in the methods of the invention may be native or obtained by recombinant techniques, and may be from any source, including mammalian sources such as, e.g., mouse, rat, rabbit, primate, pig, and human. Preferably such polypeptides are derived from a human source, and more preferably are recombinant, human proteins from hybridoma cell lines.

The pharmaceutical compositions useful in the methods of the invention may comprise biologically active variants of the antagonist anti-CD40 antibodies of the

invention. Such variants should retain the desired biological activity of the native polypeptide such that the pharmaceutical composition comprising the variant polypeptide has the same therapeutic effect as the pharmaceutical composition comprising the native polypeptide when administered to a subject. That is, the variant anti-CD40 antibody will serve as a therapeutically active component in the pharmaceutical composition in a manner similar to that observed for the native antagonist antibody, for example CHIR-5.9 or CHIR-12.12 as expressed by the hybridoma cell line 5.9 or 12.12, respectively. Methods are available in the art for determining whether a variant anti-CD40 antibody retains the desired biological activity, and hence serves as a therapeutically active component in the pharmaceutical composition. Biological activity of antibody variants can be measured using assays specifically designed for measuring activity of the native antagonist antibody, including assays described in the present invention.

Any pharmaceutical composition comprising an antagonist anti-CD40 antibody having the binding properties described herein as the therapeutically active component can be used in the methods of the invention. Thus liquid, lyophilized, or spray-dried compositions comprising one or more of the antagonist anti-CD40 antibodies of the invention may be prepared as an aqueous or nonaqueous solution or suspension for subsequent administration to a subject in accordance with the methods of the invention. Each of these compositions will comprise at least one of the antagonist anti-CD40 antibodies of the present invention as a therapeutically or prophylactically active component. By "therapeutically or prophylactically active component" is intended the anti-CD40 antibody is specifically incorporated into the composition to bring about a desired therapeutic or prophylactic response with regard to treatment, prevention, or diagnosis of a disease or condition within a subject when the pharmaceutical composition is administered to that subject. Preferably the pharmaceutical compositions comprise appropriate stabilizing agents, bulking agents, or both to minimize problems associated with loss of protein stability and biological activity during preparation and storage.

Formulants may be added to pharmaceutical compositions comprising an antagonist anti-CD40 antibody of the invention. These formulants may include, but are not limited to, oils, polymers, vitamins, carbohydrates, amine acids, salts, buffers, albumin, surfactants, or bulking agents. Preferably carbohydrates include sugar or sugar

alcohols such as mono-, di-, or polysaccharides, or water soluble glucans. The saccharides or glucans can include fructose, glucose, mannose, sorbose, xylose, maltose, sucrose, dextran, pullulan, dextrin, α and β cyclodextrin, soluble starch, hydroxyethyl starch, and carboxymethylcellulose, or mixtures thereof. "Sugar alcohol" is defined as a C_4 to C_8 hydrocarbon having a hydroxyl group and includes galactitol, inositol, mannitol, xylitol, sorbitol, glycerol, and arabitol. These sugars or sugar alcohols may be used individually or in combination. The sugar or sugar alcohol concentration is between 1.0% and 7% w/v., more preferably between 2.0% and 6.0% w/v. Preferably amino acids include levorotary (L) forms of carnitine, arginine, and betaine; however, other amino acids may be added. Preferred polymers include polyvinylpyrrolidone (PVP) with an average molecular weight between 2,000 and 3,000, or polyethylene glycol (PEG) with an average molecular weight between 3,000 and 5,000. Surfactants that can be added to the formulation are shown in EP Nos. 270,799 and 268,110.

Additionally, antibodies can be chemically modified by covalent conjugation to a polymer to increase their circulating half-life, for example. Preferred polymers, and methods to attach them to peptides, are shown in U.S. Patent Nos. 4,766,106; 4,179,337; 4,495,285; and 4,609,546; which are all hereby incorporated by reference in their entireties. Preferred polymers are polyoxyethylated polyols and polyethylene glycol (PEG). PEG is soluble in water at room temperature and has the general formula: R(O–CH_2 –CH_2)$_n$ O–R where R can be hydrogen, or a protective group such as an alkyl or alkanol group. Preferably, the protective group has between 1 and 8 carbons, more preferably it is methyl. The symbol n is a positive integer, preferably between 1 and 1,000, more preferably between 2 and 500. The PEG has a preferred average molecular weight between 1,000 and 40,000, more preferably between 2,000 and 20,000, most preferably between 3,000 and 12,000. Preferably, PEG has at least one hydroxy group, more preferably it is a terminal hydroxy group. It is this hydroxy group which is preferably activated to react with a free amino group on the inhibitor. However, it will be understood that the type and amount of the reactive groups may be varied to achieve a covalently conjugated PEG/antibody of the present invention.

Water-soluble polyoxyethylated polyols are also useful in the present invention. They include polyoxyethylated sorbitol, polyoxyethylated glucose, polyoxyethylated

glycerol (POG), and the like. POG is preferred. One reason is because the glycerol backbone of polyoxyethylated glycerol is the same backbone occurring naturally in, for example, animals and humans in mono-, di-, triglycerides. Therefore, this branching would not necessarily be seen as a foreign agent in the body. The POG has a preferred molecular weight in the same range as PEG. The structure for POG is shown in Knauf *et al.* (1988) *J. Bio. Chem.* 263:15064-15070, and a discussion of POG/IL-2 conjugates is found in U.S. Patent No. 4,766,106, both of which are hereby incorporated by reference in their entireties.

Another drug delivery system for increasing circulatory half-life is the liposome. Methods of preparing liposome delivery systems are discussed in Gabizon *et al.* (1982) *Cancer Research* 42:4734; Cafiso (1981) *Biochem Biophys Acta* 649:129; and Szoka (1980) *Ann. Rev. Biophys. Eng.* 9:467. Other drug delivery systems are known in the art and are described in, *e.g.*, Poznansky *et al.* (1980) *Drug Delivery Systems* (R.L. Juliano, ed., Oxford, N.Y.) pp. 253-315; Poznansky (1984) *Pharm Revs* 36:277.

The formulants to be incorporated into a pharmaceutical composition should provide for the stability of the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof. That is, the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof should retain its physical and/or chemical stability and have the desired biological activity, i.e., one or more of the antagonist activities defined herein above, including, but not limited to, inhibition of immunoglobulin secretion by normal human peripheral B cells stimulated by T cells; inhibition of survival and/or proliferation of normal human peripheral B cells stimulated by Jurkat T cells; inhibition of survival and/or proliferation of normal human peripheral B cells stimulated by CD40L-expressing cells or soluble CD40 ligand (sCD40L); inhibition of "survival" anti-apoptotic intracellular signals in any cell stimulated by sCD40L or solid-phase CD40L; inhibition of CD40 signal transduction in any cell upon ligation with sCD40L or solid-phase CD40L; and inhibition of proliferation of human malignant B cells as noted elsewhere herein.

Methods for monitoring protein stability are well known in the art. See, for example, Jones (1993) *Adv. Drug Delivery Rev.* 10:29-90; Lee, ed. (1991) *Peptide and Protein Drug Delivery* (Marcel Dekker, Inc., New York, New York); and the stability assays disclosed herein below. Generally, protein stability is measured at a chosen

temperature for a specified period of time. In preferred embodiments, a stable antibody pharmaceutical formulation provides for stability of the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof when stored at room temperature (about 25°C) for at least 1 month, at least 3 months, or at least 6 months, and/or is stable at about 2-8°C for at least 6 months, at least 9 months, at least 12 months, at least 18 months, at least 24 months.

A protein such as an antibody, when formulated in a pharmaceutical composition, is considered to retain its physical stability at a given point in time if it shows no visual signs (i.e., discoloration or loss of clarity) or measurable signs (for example, using size-exclusion chromatography (SEC) or UV light scattering) of precipitation, aggregation, and/or denaturation in that pharmaceutical composition. With respect to chemical stability, a protein such as an antibody, when formulated in a pharmaceutical composition, is considered to retain its chemical stability at a given point in time if measurements of chemical stability are indicative that the protein (i.e., antibody) retains the biological activity of interest in that pharmaceutical composition. Methods for monitoring changes in chemical stability are well known in the art and include, but are not limited to, methods to detect chemically altered forms of the protein such as result from clipping, using, for example, SDS-PAGE, SEC, and/or matrix-assisted laser desorption ionization/time of flight mass spectrometry; and degradation associated with changes in molecular charge (for example, associated with deamidation), using, for example, ion-exchange chromatography. See, for example, the methods disclosed herein below.

An antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof, when formulated in a pharmaceutical composition, is considered to retain a desired biological activity at a given point in time if the desired biological activity at that time is within about 30%, preferably within about 20% of the desired biological activity exhibited at the time the pharmaceutical composition was prepared as determined in a suitable assay for the desired biological activity. Assays for measuring the desired biological activity of the antagonist anti-CD40 antibodies disclosed herein, and antigen-binding fragments thereof, can be performed as described in the Examples herein. See also the assays described in 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; and U.S. Patent Nos. 5,674,492 and 5,847,082; herein incorporated by reference.

In some embodiments of the invention, the antagonist anti-CD40 antibody, for example, the CHIR-12.12 or CHIR-5.9 monoclonal antibody, or antigen-binding fragment thereof is formulated in a liquid pharmaceutical formulation. The antagonist anti-CD40 antibody or antigen binding fragment thereof can be prepared using any method known in the art, including those methods disclosed herein above. In one embodiment, the antagonist anti-CD40 antibody, for example, the CHIR-12.12 or CHIR-5.9 monoclonal antibody, or antigen-binding fragment thereof is recombinantly produced in a CHO cell line.

Following its preparation and purification, the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof can be formulated as a liquid pharmaceutical formulation in the manner set forth herein. Where the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof is to be stored prior to its formulation, it can be frozen, ro example, at ≤-20°C, and then thawed at room temperature for further formulation. The liquid pharmaceutical formulation comprises a therapeutically effective amount of the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof. The amount of antibody or antigen-binding fragment thereof present in the formulation takes into consideration the route of administration and desired dose volume.

In this manner, the liquid pharmaceutical composition comprises the antagonist anti-CD40 antibody, for example, the CHIR-12.12 or CHIR-5.9 antibody, or antigen-binding fragment thereof at a concentration of about 0.1 mg/ml to about 50.0 mg/ml, about 0.5 mg/ml to about 40.0 mg/ml, about 1.0 mg/ml to about 30.0 mg/ml, about 5.0 mg/ml to about 25.0 mg/ml, about 5.0 mg/ml to about 20.0 mg/ml, or about 15.0 mg/ml to about 25.0 mg/ml. In some embodiments, the liquid pharmaceutical composition comprises the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof at a concentration of about 0.1 mg/ml to about 5.0 mg/ml, about 5.0 mg/ml to about 10.0 mg/ml, about 10.0 mg/ml to about 15.0 mg/ml, about 15.0 mg/ml to about 20.0 mg/ml,

about 20.0 mg/ml to about 25.0 mg/ml, about 25.0 mg/ml to about 30.0 mg/ml, about 30.0 mg/ml to about 35.0 mg/ml, about 35.0 mg/ml to about 40.0 mg/ml, about 40.0 mg/ml to about 45.0 mg/ml, or about 45.0 mg/ml to about 50.0 mg/ml. In other embodiments, the liquid pharmaceutical composition comprises the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof at a concentration of about 15.0 mg/ml, about 16.0 mg/ml, about 17.0 mg/ml, about 18.0 mg/ml, about 19.0 mg/ml, about 20.0 mg/ml, about 21.0 mg/ml, about 22.0 mg/ml, about 23.0 mg/ml, about 24.0 mg/ml, or about 25.0 mg/ml. The liquid pharmaceutical composition comprises the antagonist anti-CD40 antibody, for example, the CHIR-12.12 or CHIR-5.9 antibody, or antigen-binding fragment thereof and a buffer that maintains the pH of the formulation in the range of about pH 5.0 to about pH 7.0, including about 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, and other such values within the range of about pH 5.0 to about pH 7.0. In some embodiments, the buffer maintains the pH of the formulation in the range of about pH 5.0 to about pH 6.5, about pH 5.0 to about pH 6.0, about pH 5.0 to about pH 5.5, about pH 5.5 to about 7.0, about pH 5.5 to about pH 6.5, or about pH 5.5 to about pH 6.0.

Any suitable buffer that maintains the pH of the liquid anti-CD40 antibody formulation in the range of about pH 5.0 to about pH 7.0 can be used in the formulation, so long as the physicochemical stability and desired biological activity of the antibody are retained as noted herein above. Suitable buffers include, but are not limited to, conventional acids and salts thereof, where the counter ion can be, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or magnesium. Examples of conventional acids and salts thereof that can be used to buffer the pharmaceutical liquid formulation include, but are not limited to, succinic acid or succinate, citric acid or citrate, acetic acid or acetate, tartaric acid or tartarate, phosphoric acid or phosphate, gluconic acid or gluconate, glutamic acid or glutamate, aspartic acid or aspartate, maleic acid or maleate, and malic acid or malate buffers. The buffer concentration within the formulation can be from about 1 mM to about 50 mM, including about 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, or other such values within the range of about 1 mM to about 50 mM. In some embodiments, the buffer concentration within the formulation is from about 5 mM to about 15 mM, including

about 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, or other such values within the range of about 5 mM to about 15 mM.

In some embodiments of the invention, the liquid pharmaceutical formulation comprises a therapeutically effective amount of the antagonist anti-CD40 antibody, for example, the CHIR-12.12 or CHIR-5.9 monoclonal antibody, or antigen-binding fragment thereof and succinate buffer or citrate buffer at a concentration that maintains the pH of the formulation in the range of about pH 5.0 to about pH 7.0, preferably about pH 5.0 to about pH 6.5. By "succinate buffer" or "citrate buffer" is intended a buffer comprising a salt of succinic acid or a salt of citric acid, respectively. In a preferred embodiment, the succinate or citrate counterion is the sodium cation, and thus the buffer is sodium succinate or sodium citrate, respectively. However, any cation is expected to be effective. Other possible succinate or citrate cations include, but are not limited to, potassium, ammonium, calcium, and magnesium. As noted above, the succinate or citrate buffer concentration within the formulation can be from about 1 mM to about 50 mM, including about 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, or other such values within the range of about 1 mM to about 50 mM. In some embodiments, the buffer concentration within the formulation is from about 5 mM to about 15 mM, including about 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, or about 15 mM. In other embodiments, the liquid pharmaceutical formulation comprises the antagonist anti-CD40 antibody, for example, the CHIR-12.12 or CHIR-5.9 monoclonal antibody, or antigen-binding fragment thereof at a concentration of about 0.1 mg/ml to about 50.0 mg/ml, or about 5.0 mg/ml to about 25.0 mg/ml, and succinate or citrate buffer, for example, sodium succinate or sodium citrate buffer, at a concentration of about 1 mM to about 20 mM, about 5 mM to about 15 mM, preferably about 10 mM.

Where it is desirable for the liquid pharmaceutical formulation to be near isotonic, the liquid pharmaceutical formulation comprising a therapeutically effective amount of the antagonist anti-CD40 antibody, for example, the CHIR-12.12 or CHIR-5.9 monoclonal antibody, or antigen-binding fragment thereof, and a buffer to maintain the pH of the formulation within the range of about pH 5.0 to about pH 7.0 can further comprise an amount of an isotonizing agent sufficient to render the formulation near

isotonic. By "near isotonic" is intended the aqueous formulation has an osmolarity of about 240 mmol/kg to about 360 mmol/kg, preferably about 240 to about 340 mmol/kg, more preferably about 250 to about 330 mmol/kg, even more preferably about 260 to about 320 mmol/kg, still more preferably about 270 to about 310 mmol/kg. Methods of determining the isotonicity of a solution are known to those skilled in the art. See, for example, Setnikar *et al.* (1959) *J. Am. Pharm. Assoc.* 48:628.

Those skilled in the art are familiar with a variety of pharmaceutically acceptable solutes useful in providing isotonicity in pharmaceutical compositions. The isotonizing agent can be any reagent capable of adjusting the osmotic pressure of the liquid pharmaceutical formulation of the present invention to a value nearly equal to that of a body fluid. It is desirable to use a physiologically acceptable isotonizing agent. Thus, the liquid pharmaceutical formulation comprising a therapeutically effective amount of the antagonist anti-CD40 antibody, for example, the CHIR-12.12 or CHIR-5.9 monoclonal antibody, or antigen-binding fragment thereof, and a buffer to maintain the pH of the formulation within the range of about pH 5.0 to about pH 7.0, can further comprise components that can be used to provide isotonicity, for example, sodium chloride; amino acids such as alanine, valine, and glycine; sugars and sugar alcohols (polyols), including, but not limited to, glucose, dextrose, fructose, sucrose, maltose, mannitol, trehalose, glycerol, sorbitol, and xylitol; acetic acid, other organic acids or their salts, and relatively minor amounts of citrates or phosphates. The ordinary skilled person would know of additional agents that are suitable for providing optimal tonicity of the liquid formulation.

In some preferred embodiments, the liquid pharmaceutical formulation comprising a therapeutically effective amount of the antagonist anti-CD40 antibody, for example, the CHIR-12.12 or CHIR-5.9 monoclonal antibody, or antigen-binding fragment thereof, and a buffer to maintain the pH of the formulation within the range of about pH 5.0 to about pH 7.0, further comprises sodium chloride as the isotonizing agent. The concentration of sodium chloride in the formulation will depend upon the contribution of other components to tonicity. In some embodiments, the concentration of sodium chloride is about 50 mM to about 300 mM, about 50 mM to about 250 mM, about 50 mM to about 200 mM, about 50 mM to about 175 mM, about 50 mM to about 150 mM, about 75 mM to about 175 mM, about 75 mM to about 150 mM, about 100 mM to

about 175 mM, about 100 mM to about 200 mM, about 100 mM to about 150 mM, about 125 mM to about 175 mM, about 125 mM to about 150 mM, about 130 mM to about 170 mM, about 130 mM to about 160 mM, about 135 mM to about 155 mM, about 140 mM to about 155 mM, or about 145 mM to about 155 mM. In one such embodiment, the concentration of sodium chloride is about 150 mM. In other such embodiments, the concentration of sodium chloride is about 150 mM, the buffer is sodium succinate or sodium citrate buffer at a concentration of about 5 mM to about 15 mM, the liquid pharmaceutical formulation comprises a therapeutically effective amount of the antagonist anti-CD40 antibody, for example, the CHIR-12.12 or CHIR-5.9 monoclonal antibody, or antigen-binding fragment thereof, and the formulation has a pH of about pH 5.0 to about pH 7.0, about pH 5.0 to about pH 6.0, or about pH 5.5 to about pH 6.5. In other embodiments, the liquid pharmaceutical formulation comprises the antagonist anti-CD40 antibody, for example, the CHIR-12.12 or CHIR-5.9 monoclonal antibody, or antigen-binding fragment thereof, at a concentration of about 0,1 mg/ml to about 50.0 mg/ml or about 5.0 mg/ml to about 25.0 mg/ml, about 150 mM sodium chloride, and about 10 mM sodium succinate or sodium citrate, at a pH of about pH 5.5.

Protein degradation due to freeze thawing or mechanical shearing during processing of a liquid pharmaceutical formulations of the present invention can be inhibited by incorporation of surfactants into the formulation in order to lower the surface tension at the solution-air interface. Thus, in some embodiments, the liquid pharmaceutical formulation comprises a therapeutically effective amount of the antagonist anti-CD40 antibody, for example, the CHIR-12.12 or CHIR-5.9 monoclonal antibody, or antigen-binding fragment thereof, a buffer to maintain the pH of the formulation within the range of about pH 5.0 to about pH 7.0, and further comprises a surfactant. In other embodiments, the liquid pharmaceutical formulation comprises a therapeutically effective amount of the antagonist anti-CD40 antibody, for example, the CHIR-12.12 or CHIR-5.9 monoclonal antibody, or antigen-binding fragment thereof, a buffer to maintain the pH of the formulation within the range of about pH 5.0 to about pH 7.0, an isotonizing agent such as sodium chloride at a concentration of about 50 mM to about 300 mM, and further comprises a surfactant.

Typical surfactants employed are nonionic surfactants, including polyoxyethylene sorbitol esters such as polysorbate 80 (Tween 80) and polysorbate 20 (Tween 20); polyoxypropylene-polyoxyethylene esters such as Pluronic F68; polyoxyethylene alcohols such as Brij 35; simethicone; polyethylene glycol such as PEG400; lysophosphatidylcholine; and polyoxyethylene-p-t-octylphenol such as Triton X-100. Classic stabilization of pharmaceuticals by surfactants or emulsifiers is described, for example, in Levine *et al.* (1991) *J. Parenteral Sci. Technol.* 45(3):160-165, herein incorporated by reference. A preferred surfactant employed in the practice of the present invention is polysorbate 80. Where a surfactant is included, it is typically added in an amount from about 0.001 % to about 1.0% (w/v), about 0.001% to about 0.5%, about 0.001% to about 0.4%, about 0.001% to about 0.3%, about 0.001% to about 0.2%, about 0.005% to about 0.5%, about 0.005% to about 0.2%, about 0.01% to about 0.5%, about 0.01% to about 0.2%, about 0.03% to about 0.5%, about 0.03% to about 0.3%, about 0.05% to about 0.5%, or about 0.05% to about 0.2%.

Thus, in some embodiments, the liquid pharmaceutical formulation comprises a therapeutically effective amount of the antagonist anti-CD40 antibody, for example, the CHIR-12.12 or CHIR-5.9 monoclonal antibody, or antigen-binding fragment thereof, the buffer is sodium succinate or sodium citrate buffer at a concentration of about 1 mM to about 50 mM, about 5 mM to about 25 mM, or about 5 mM to about 15 mM; the formulation has a pH of about pH 5.0 to about pH 7.0, about pH 5.0 to about pH 6.0, or about pH 5.5 to about pH 6.5; and the formulation further comprises a surfactant, for example, polysorbate 80, in an amount from about 0.001% to about 1.0% or about 0.001% to about 0.5%. Such formulations can optionally comprise an isotonizing agent, such as sodium chloride at a concentration of about 50 mM to about 300 mM, about 50 mM to about 200 mM, or about 50 mM to about 150 mM. In other embodiments, the liquid pharmaceutical formulation comprises the antagonist anti-CD40 antibody, for example, the CHIR-12.12 or CHIR-5.9 monoclonal antibody, or antigen-binding fragment thereof, at a concentration of about 0.1 mg/ml to about 50.0 mg/ml or about 5.0 mg/ml to about 25.0 mg/ml, including about 20.0 mg/ml; about 50 mM to about 200 mM sodium chloride, including about 150 mM sodium chloride; sodium succinate or sodium citrate at about 5 mM to about 20 mM, including about 10 mM sodium succinate or

sodium citrate; sodium chloride at a concentration of about 50 mM to about 200 mM, including about 150 mM; and optionally a surfactant, for example, polysorbate 80, in an amount from about 0.001% to about 1.0%, including about 0.001% to about 0.5%; where the liquid pharmaceutical formulation has a pH of about pH 5.0 to about pH 7.0, about pH 5.0 to about pH 6.0, about pH 5.0 to about pH 5.5, about pH 5.5 to about pH 6.5, or about pH 5.5 to about pH 6.0.

The liquid pharmaceutical formulation can be essentially free of any preservatives and other carriers, excipients, or stabilizers noted herein above. Alternatively, the formulation can include one or more preservatives, for example, antibacterial agents, pharmaceutically acceptable carriers, excipients, or stabilizers described herein above provided they do not adversely affect the physicochemical stability of the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof. Examples of acceptable carriers, excipients, and stabilizers include, but are not limited to, additional buffering agents, co-solvents, surfactants, antioxidants including ascorbic acid and methionine, chelating agents such as EDTA, metal complexes (for example, Zn-protein complexes), and biodegradable polymers such as polyesters. A thorough discussion of formulation and selection of pharmaceutically acceptable carriers, stabilizers, and isomolytes can be found in *Remington's Pharmaceutical Sciences* (18th ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990), herein incorporated by reference.

After the liquid pharmaceutical formulation or other pharmaceutical composition described herein is prepared, it can be lyophilized to prevent degradation. Methods for lyophilizing liquid compositions are known to those of ordinary skill in the art. Just prior to use, the composition may be reconstituted with a sterile diluent (Ringer's solution, distilled water, or sterile saline, for example) that may include additional ingredients. Upon reconstitution, the composition is preferably administered to subjects using those methods that are known to those skilled in the art.

Use of Antagonist Anti-CD40 Antibodies in the Manufacture of Medicaments

The present invention also provides for the use of an antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof in the manufacture of a medicament for treating a subject for a cancer characterized by neoplastic B cell growth, wherein the

medicament is coordinated with treatment with at least one other cancer therapy. Cancers characterized by neoplastic B cell growth include, but are not limited to, the B cell-related cancers discussed herein above, for example, non-Hodgkin's lymphoma, chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma, B cell lymphoma, high-grade B cell lymphoma, intermediate-grade B cell lymphoma, low-grade B cell lymphoma, B cell acute lympohoblastic leukemia, myeloblastic leukemia, Hodgkin's disease, plasmacytoma, follicular lymphoma, follicular small cleaved lymphoma, follicular large cell lymphoma, follicular mixed small cleaved lymphoma, diffuse small cleaved cell lymphoma, diffuse small lymphocytic lymphoma, prolymphocytic leukemia, lymphoplasmacytic lymphoma, marginal zone lymphoma, mucosal associated lymphoid tissue lymphoma, monocytoid B cell lymphoma, splenic lymphoma, hairy cell leukemia, diffuse large cell lymphoma, mediastinal large B cell lymphoma, lymphomatoid granulomatosis, intravascular lymphomatosis, diffuse mixed cell lymphoma, diffuse large cell lymphoma, immunoblastic lymphoma, Burkitt's lymphoma, AIDS-related lymphoma, and mantle cell lymphoma.

By "coordinated" is intended the medicament comprising the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof is to be used either prior to, during, or after treatment of the subject with at least one other cancer therapy. Examples of other cancer therapies include, but are not limited to, surgery; radiation therapy; chemotherapy, optionally in combination with autologous bone marrow transplant, where suitable chemotherapeutic agents include, but are not limited to, fludarabine or fludarabine phosphate, chlorambucil, vincristine, pentostatin, 2-chlorodeoxyadenosine (cladribine), cyclophosphamide, doxorubicin, prednisone, and combinations thereof, for example, anthracycline-containing regimens such as CAP (cyclophosphamide, doxorubicin plus prednisone), CHOP (cyclophosphamide, vincristine, prednisone plus doxorubicin), VAD (vincritsine, doxorubicin, plus dexamethasone), MP (melphalan plus prednisone), and other cytotoxic and/or therapeutic agents used in chemotherapy such as mitoxantrone, daunorubicin, idarubicin, asparaginase, and antimetabolites, including, but not limited to, cytarabine, methotrexate, 5-fluorouracil decarbazine, 6-thioguanine, 6-mercaptopurine, and nelarabine; other anti-cancer monoclonal antibody therapy (for example, alemtuzumab (Campath®) or other anti-CD52 antibody targeting the CD52 cell-surface

glycoprotein on malignant B cells; rituximab (Rituxan®), the fully human antibody HuMax-CD20, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar®), ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), or any other therapeutic anti-CD20 antibody targeting the CD20 antigen on malignant B cells; anti-CD19 antibody (for example, MT103, a bispecific antibody); anti-CD22 antibody (for example, the humanized monoclonal antibody epratuzumab); bevacizumab (Avastin®) or other anti-cancer antibody targeting human vascular endothelial growth factor; anti-CD22 antibody targeting the CD22 antigen on malignant B cells (for example, the monoclonal antibody BL-22, an alphaCD22 toxin); α-M-CSF antibody targeting macrophage colony stimulating factor; antibodies targeting the receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK) and its ligand (RANKL), which are overexpressed in multiple myeloma; anti-CD23 antibody targeting the CD23 antigen on malignant B cells (for example, IDEC-152); anti-CD38 antibody targeting the CD38 antigen on malignant B cells; antibodies targeting major histocompatibility complex class II receptors (anti-MHC antibodies) expressed on malignant B cells; other anti-CD40 antibodies (for example, SGN-40) targeting the CD40 antigen on malignant B cells; and antibodies targeting tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) (for example, the agonistic human monoclonal antibody HGS-ETR1) expressed on a number of solid tumors and tumors of hematopoietic origin); small molecule-based cancer therapy, including, but not limited to, microtubule and/or topoisomerase inhibitors (for example, the mitotic inhibitor dolastatin and dolastatin analogues; the tubulin-binding agent T900607; XL119; and the topoisomerase inhibitor aminocamptothecin), SDX-105 (bendamustine hydrochloride), ixabepilone (an epothilone analog, also referred to as BMS-247550), protein kinase C inhibitors, for example, midostaurin ((PKC-412, CGP 41251, N-benzoylstaurosporine), pixantrone, eloxatin (an antineoplastic agent), ganite (gallium nitrate), Thalomid® (thalidomide), immunomodulatory derivatives of thalidomide (for example, revlimid (formerly revimid)), Affinitak™ (antisense inhibitor of protein kinase C-alpha), SDX-101 (R-etodolac, inducing apoptosis of malignant lymphocytes), second-generation purine nucleoside analogs such as clofarabine, inhibitors of production of the protein Bcl-2 by cancer cells (for example, the antisense agents oblimersen and Genasense®), proteasome inhibitors (for example, Velcade™

(bortezomib)), small molecule kinase inhibitors (for example, CHIR-258), small molecule VEGF inhibitors (for example, ZD-6474), small molecule inhibitors of heat shock protein (HSP) 90 (for example, 17-AAG), small molecule inhibitors of histone deacetylases (for example, hybrid/polar cytodifferentiation HPC) agents such as suberanilohydroxamic acid (SAHA), and FR-901228) and apoptotic agents such as Trisenox® (arsenic trioxide) and Xcytrin® (motexafin gadolinium); vaccine /immunotherapy-based cancer therapies, including, but not limited to, vaccine approaches (for example, Id-KLH, oncophage, vitalethine), personalized immunotherapy or active idiotype immunotherapy (for example, MyVax® Personalized Immunotherapy, formally designated GTOP-99), Promune® (CpG 7909, a synthetic agonist for toll-like receptor 9 (TLR9)), interferon-alpha therapy, interleukin-2 (IL-2) therapy, IL-12 therapy; IL-15 therapy, and IL-21 therapy; steroid therapy; or other cancer therapy; where treatment with the additional cancer therapy, or additional cancer therapies, occurs prior to, during, or subsequent to treatment of the subject with the medicament comprising the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof, as noted herein above.

In some embodiments, the present invention provides for the use of the anti-CD40 antibody, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding fragment thereof in the manufacture of a medicament for treating a B cell lymphoma, for example non-Hodgkin's lymphoma, in a subject, wherein the medicament is coordinated with treatment with at least one other cancer therapy selected from the group consisting of chemotherapy, anti-cancer antibody therapy, small molecule-based cancer therapy, and vaccine/immunotherapy-based cancer therapy, wherein the medicament is to be used either prior to, during, or after treatment of the subject with the other cancer therapy or, in the case of multiple combination therapies, either prior to, during, or after treatment of the subject with the other cancer therapies.

Thus, for example, in some embodiments, the invention provides for the use of the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding fragment thereof, in the manufacture of a medicament for treating a B cell lymphoma, for example, non-Hodgkin's lymphoma, in a subject, wherein the medicament is coordinated with treatment with chemotherapy, where the chemotherapeutic agent is selected from the group consisting of cytoxan, doxorubicin, vincristine, prednisone, and combinations

thereof, for example CHOP. In other embodiments, the invention provides for the use of the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding fragment thereof, in the manufacture of a medicament for treating a B cell lymphoma, for example non-Hodgkin's lymphoma, in a subject, wherein the medicament is coordinated with treatment with at least one other anti-cancer antibody selected from the group consisting of alemtuzumab (Campath®) or other anti-CD52 antibody targeting the CD52 cell-surface glycoprotein on malignant B cells; rituximab (Rituxan®), the fully human antibody HuMax-CD20, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar®), ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), or any other therapeutic anti-CD20 antibody targeting the CD20 antigen on malignant B cells; anti-CD19 antibody (for example, MT103, a bispecific antibody); anti-CD22 antibody (for example, the humanized monoclonal antibody epratuzumab); bevacizumab (Avastin®) or other anti-cancer antibody targeting human vascular endothelial growth factor; and any combinations thereof; wherein the medicament is to be used either prior to, during, or after treatment of the subject with the other cancer therapy or, in the case of multiple combination therapies, either prior to, during, or after treatment of the subject with the other cancer therapies.

In yet other embodiments, the present invention provides for the use of the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding fragment thereof, in the manufacture of a medicament for treating a B cell lymphoma, for example non-Hodgkin's lymphoma, in a subject, wherein the medicament is coordinated with treatment with at least one other small molecule-based cancer therapy selected from the group consisting of microtubule and/or topoisomerase inhibitors (for example, the mitotic inhibitor dolastatin and dolastatin analogues; the tubulin-binding agent T900607; XL119; and the topoisomerase inhibitor aminocamptothecin), SDX-105 (bendamustine hydrochloride), ixabepilone (an epothilone analog, also referred to as BMS-247550), protein kinase C inhibitors, for example, midostaurin ((PKC-412, CGP 41251, N-benzoylstaurosporine), pixantrone, eloxatin (an antineoplastic agent), ganite (gallium nitrate), Thalomid® (thalidomide), an apoptotic agent such as Xcytrin® (motexafin gadolinium), inhibitors of production of the protein Bcl-2 by cancer cells (for example, the antisense agents oblimersen and Genasense®), nelarabine, and any combinations

thereof; wherein the medicament is to be used either prior to, during, or after treatment of the subject with the other cancer therapy or, in the case of multiple combination therapies, either prior to, during, or after treatment of the subject with the other cancer therapies.

In still other embodiments, the present invention provides for the use of the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding fragment thereof, in the manufacture of a medicament for treating a B cell lymphoma, for example non-Hodgkin's lymphoma, in a subject, wherein the medicament is coordinated with treatment with at least one other vaccine/immunotherapy-based cancer therapy selected from the group consisting of vaccine approaches (for example, Id-KLH, oncophage, vitalethine), personalized immunotherapy or active idiotype immunotherapy (for example, MyVax® Personalized Immunotherapy, formally designated GTOP-99), Promune® (CpG 7909, a synthetic agonist for toll-like receptor 9 (TLR9)), interleukin-2 (IL-2) therapy, IL-12 therapy; IL-15 therapy, and IL-21 therapy, and any combinations thereof; wherein the medicament is to be used either prior to, during, or after treatment of the subject with the other cancer therapy or, in the case of multiple combination therapies, either prior to, during, or after treatment of the subject with the other cancer therapies.

In some embodiments, the present invention provides for the use of the anti-CD40 antibody, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding fragment thereof in the manufacture of a medicament for treating a B cell-related leukemia, for example B-cell acute lymphocytic leukemia (B-ALL), in a subject, wherein the medicament is coordinated with treatment with at least one other cancer therapy selected from the group consisting of chemotherapy and anti-metabolite therapy, wherein the medicament is to be used either prior to, during, or after treatment of the subject with the other cancer therapy or, in the case of multiple combination therapies, either prior to, during, or after treatment of the subject with the other cancer therapies. Examples of such embodiments include, but are not limited to, those instances where the medicament comprising the antagonist anti-CD40 antibody, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding fragment thereof is coordinated with treatment with a chemotherapeutic agent or anti-metabolite selected from the group

consisting of cytoxan, doxorubicin, vincristine, prednisone, cytarabine, mitoxantrone, idarubicin, asparaginase, methotrexate, 6-thioguanine, 6-mercaptopurine, and combinations thereof; wherein the medicament is to be used either prior to, during, or after treatment of the subject with the other cancer therapy or, in the case of multiple combination therapies, either prior to, during, or after treatment of the subject with the other cancer therapies. In one such example, the medicament is coordinated with treatment with cytarabine plus daunorubicin, cytarabine plus mitoxantrone, and/or cytarabine plus idarubicin; wherein the medicament is to be used either prior to, during, or after treatment of the B-ALL subject with the other cancer therapy or, in the case of multiple combination therapies, either prior to, during, or after treatment of the subject with the other cancer therapies.

The invention also provides for the use of an antagonist anti-CD40 antibody, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9 disclosed herein, or antigen-binding fragment thereof in the manufacture of a medicament for treating a subject for a cancer characterized by neoplastic B cell growth, including the B cell-related cancers described herein above, wherein the medicament is used in a subject that has been pretreated with at least one other cancer therapy. By "pretreated" or "pretreatment" is intended the subject has received one or more other cancer therapies (i.e., been treated with at least one other cancer therapy) prior to receiving the medicament comprising the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof. "Pretreated" or "pretreatment" includes subjects that have been treated with at least one other cancer therapyy within 2 years, within 18 months, within 1 year, within 6 months, within 2 months, within 6 weeks, within 1 month, within 4 weeks, within 3 weeks, within 2 weeks, within 1 week, within 6 days, within 5 days, within 4 days, within 3 days, within 2 days, or even within 1 day prior to initiation of treatment with the medicament comprising the antagonist anti-CD40 antibody, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9 disclosed herein, or antigen-binding fragment thereof. It is not necessary that the subject was a responder to pretreatment with the prior cancer therapy, or prior cancer therapies. Thus, the subject that receives the medicament comprising the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof could have responded, or could have failed to respond (i.e. the cancer was refractory), to

pretreatment with the prior cancer therapy, or to one or more of the prior cancer therapies where pretreatment comprised multiple cancer therapies. Examples of other cancer therapies for which a subject can have received pretreatment prior to receiving the medicament comprising the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof include, but are not limited to, surgery; radiation therapy; chemotherapy, optionally in combination with autologous bone marrow transplant, where suitable chemotherapeutic agents include, but are not limited to, those listed herein above; other anti-cancer monoclonal antibody therapy, including, but not limited to, those anti-cancer antibodies listed herein above; small molecule-based cancer therapy, including, but not limited to, the small molecules listed herein above; vaccine/immunotherapy-based cancer therapies, including, but limited to, those listed herein above; steroid therapy; other cancer therapy; or any combination thereof.

"Treatment" in the context of coordinated use of a medicament described herein with one or more other cancer therapies is herein defined as the application or administration of the medicament or of the other cancer therapy to a subject, or application or administration of the medicament or other cancer therapy to an isolated tissue or cell line from a subject, where the subject has a cancer characterized by neoplastic B cell growth, a symptom associated with such a cancer, or a predisposition toward development of such a cancer, where the purpose is to cure, heal, alleviate, relieve, alter, remedy, ameliorate, improve, or affect the cancer, any associated symptoms of the cancer, or the predisposition toward the development of the cancer.

The following examples are offered by way of illustration and not by way of limitation.

EXPERIMENTAL

The antagonist anti-CD40 antibodies used in the examples below are CHIR-5.9 and CHIR-12.12. The CHIR-5.9 and CHIR-12.12 anti-CD40 antibodies are human IgG_1 subtype anti-human CD40 monoclonal antibodies (mAbs) generated by immunization of transgenic mice bearing the human IgG_1 heavy chain locus and the human κ light chain locus (XenoMouse® technology; Abgenix; Fremont, California). As shown by FACS analysis, CHIR-5.9 and CHIR-12.12 bind specifically to human CD40 and can prevent

CD40 ligand binding. Both mAbs can compete off CD40-ligand pre-bound to cell surface CD40. Both antibodies are strong antagonists and inhibit *in vitro* CD40 ligand-mediated proliferation of normal B cells, as well as cancer cells from NHL and CLL patients. *In vitro*, both antibodies kill cancer cell lines as well as primary cancer cells from NHL patients by ADCC. Dose-dependent anti-tumor activity was seen in a xenograft human lymphoma model. The binding affinity of CHIR-5.9 to human CD40 is $1.2x10^{-8}$ M and the binding affinity of CHIR-12.12 to human CD40 is $5x10^{-10}$ M.

Mouse hybridoma line 131.2F8.5.9 (CMCC#12047) and hybridoma line 153.8E2.D10.D6.12.12 (CMCC#12056) have been deposited with the American Type Culture Collection [ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209 (USA)] under Patent Deposit Number PTA-5542 and PTA-5543, respectively.

The following protocols have been used in the examples described below.

ELISA Assay for Immunoglobulin Quantification

The concentrations of human IgM and IgG were estimated by ELISA. 96-well ELISA plates were coated with 2 μg/ml goat anti-human IgG MAb (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) or with 2 μg/ml goat anti-human IgM MAb 4102 (Bio Source International, California) in 0.05 M carbonate buffer (pH 9.6), by incubation for 16 hours at 4°C. Plates were washed 3 times with PBS-0.05 % Tween-20 (PBS-Tween) and saturated with BSA for 1 hour. After 2 washes the plates were incubated for 2 hour at 37°C with different dilutions of the test samples. After 3 washes, bound Ig was detected by incubation for 2 hour at 37°C with 1 μg/ml peroxidase-labeled goat anti-human IgG MAb or goat anti-human IgM Mab. Plates were washed 4 times, and bound peroxidase activity was revealed by the addition of O-phenylenediamine as a substrate. Human IgG or IgM standards (Caltaq, Burlingame, California) was used to establish a standard curve for each assay.

Isolation of the Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) from Human Peripheral Blood

20 ml of Ficoll-Paque solution (low endotoxin; Pharmacia) was added per 50 ml polystyrene tube, in 3 tubes, 30 minutes before adding the blood. The Ficoll-Paque

solution was warmed up to room temperature. 3 L of bleach in 1:10 dilution was prepared, and used to wash all the tubes and pipettes contacting the blood. The blood was layered on the top of the Ficoll-Paque solution without disturbing the Ficoll layer, at 1:5 ml blood/1 ml of Ficoll-Paque. The tubes were centrifuged at 1700 rpm for 30 minutes at room temperature with the brake on the centrifuge turned off. As much of the top layer (plasma) as possible was removed, minimizing the vacuum in order to avoid removing the second layer of solution. The second layer, which contains the B and T lymphocytes, was collected using a sterile Pasteur pipette, and place in two 50-ml polystyrene tubes. The collection was diluted with 3 x the volume of cold RPMI with no additives, and the tubes were centrifuged at 1000 RPM for 10 minutes. The media was removed by aspiration, and the cells from both 50-ml tubes were resuspended in a total of 10 ml cold RPMI (with additives) and transferred to a 15-ml tube. The cells were counted using the hemacytometer, then centrifuged at 1000 RPM for 10 minutes. The media was removed and the cells resuspended in 4 ml RPMI. This fraction contained the PBMC.

Isolation of the B cells from PBMC

100 µl of Dynabeads (anti-h CD19) were placed in a 5-ml plastic tube. 3 ml of sterile PBS were added to the beads and mixed, and placed in the magnetic holder, then allowed to sit for 2 minutes. The solution was removed using a Pasteur pipette. 3 ml of sterile PBS were added, mixed, and placed in the magnetic holder, then allowed to sit for 2 minutes. This procedure with sterile PBS was repeated one more time for a total of 3 washes. The PBMC was added into the beads and incubated, while mixing, for 30 minutes at 40°C. The tube containing the PBMC and beads was placed into the magnetic holder for 2 minutes, then the solution was transferred to a new 5-ml tube in the magnetic holder. After 2 minutes, the solution was transferred to a new 15-ml tube. This step was repeated four more times, and the solutions of the first four times were collected in the 15-ml tube, then centrifuged at 1000 RPM for 5 minutes. This step produced the pellet for T-cell separation.

100 µl RPMI (with additives) was added to collect the beads, and the solution was transferred into a 0.7-ml tube. 10 µl of Dynal Detacha Beads were added into the

suspension at room temperature, and it was allowed to rotate for 45 minutes. The suspension was transferred into a new 5-ml tube and 3-ml of RPMI (with additives) were added. The tube was placed in the magnetic holder for 2 minutes. The solution was transferred into a new 5-ml tube in the holder for 2 minutes, then to a 15-ml tube. The previous step was repeated three more times, collecting the solution in the 15-ml tube. The 15-ml tube was centrifuged at 1000 RPM for 10 minutes, and the cells resuspended in 10 ml RMPI. The washing step was repeated 2 more times for a total of 3 washes. The cells were counted before the last centrifugation. This step completed the B-cell purification. Cells were stored in 90% FCS and 10% DMSO and frozen at - 800°C.

Isolation of the T Cells

The human T cell Enrichment Column (R&D systems, anti-h CD 3 column kit) was prepared using 20 ml of 1 X column wash buffer by mixing 2 ml of 10 X column wash buffer and 18 ml of sterile distilled water. The column was cleaned with 70% ethanol and placed on top of a 15-ml tube. The top cap of the column was removed first to avoid drawing air into the bottom of the column. Next, the bottom cap was removed, and the tip was cleaned with 70% ethanol. The fluid within the column was allowed to drain into the 15-ml tube. A new sterile 15-ml tube was placed under the column after the column buffer had drained to the level of the white filter. The B-cell depleted PBMC fraction was suspended in 1 ml of buffer and added to the top of the column. The cells were allowed to incubate with the column at room temperature for 10 minutes. The T-cells were eluted from the column with 4 aliquots of 2 ml each of 1 X column wash buffer. The collected T-cells were centrifuged at 1000 RPM for 5 minutes. The supernatant was removed and the cells resuspended in 10 ml RPMI. Cells were counted and centrifuged one more time. The supernatant was removed, completing the T-cell purification. Cells were stored in 90% FCS and 10% DMSO and frozen at -80°C.

For the above procedures, the RPMI composition contained 10% FCS (inactivated at 56°C for 45 min), 1 % Pen/Strep (100 u/ml Penicillin, 0.1 µg/ml Streptomycin), 1% Glutamate, 1% sodium puravate, 50 µM 2-ME.

Flow Cytofluorometric Assay

Ramos cells (106 cells/sample) were incubated in 100 µl primary antibody (10 µg/ml in PBS-BSA) for 20 min at 4°C. After 3 washes with PBS-BSA or HBSS- BSA, the cells were incubated in 100 µl FITC-labeled F(ab')2 fragments of goat anti-(human IgG) antibodies (Caltaq) for 20 min at 4°C. After 3 washes with PBS-BSA and 1 wash with PBS, the cells were resuspended in 0.5-ml PBS. Analyses were performed with a FACSCAN V (Becton Dickinson, San Jose, California).

Generation of Hybridoma Clones

Splenocytes from immunized mice were fused with SP 2/0 or P 3 x 63Ag8.653 murine myeloma cells at a ratio of 10:1 using 50% polyethylene glycol as previously described by de Boer *et al.* (1988) *J. Immunol. Meth.* 113:143. The fused cells were resuspended in complete IMDM medium supplemented with hypoxanthine (0.1 mM), aminopterin (0.01 mM), thymidine (0.016 mM), and 0.5 ng/ml hIL-6 (Genzyme, Cambridge, Massachusetts). The fused cells were then distributed between the wells of 96-well tissue culture plates, so that each well contained 1 growing hybridoma on average.

After 10-14 days the supernatants of the hybridoma populations were screened for specific antibody production. For the screening of specific antibody production by the hybridoma clones, the supernatants from each well were pooled and tested for anti-CD 40 activity specificity by ELISA first. The positives were then used for fluorescent cell staining of EBV-transformed B cells as described for the FACS assay above. Positive hybridoma cells were cloned twice by limiting dilution in IMDM/FBS containing 0.5 ng/ml hIL-6.

Example 1: Production of Anti-CD40 Antibodies

Several fully human, antagonist anti-CD40 monoclonal antibodies of IgG1 isotype were generated. Transgenic mice bearing the human IgG1 heavy chain locus and the human κ chain locus (Abgenix γ-1 XenoMouse® technology (Abgenix; Fremont, California)) were used to generate these antibodies. SF9 insect cells expressing CD40

extracellular domain were used as immunogen. A total of 31 mice spleens were fused with the mouse myeloma SP2/0 cells to generate 895 antibodies that recognize recombinant CD40 in ELISA (Tables 1A and 1B). On average approximately 10% of hybridomas produced using Abgenix XenoMouse® technology may contain mouse lambda light chain instead of human kappa chain. The antibodies containing mouse light lambda chain were selected out. A subset of 260 antibodies that also showed binding to cell-surface CD40 were selected for further analysis. Stable hybridomas selected during a series of subcloning procedures were used for further characterization in binding and functional assays.

Table 1A. A Typical Fusion

	anti-CD40 titer				
Fusion #	(1:100K)	Fusion Efficiency	# of wells screened	# of ELISA+	# of cell surface+
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

Table 1B. Summary of Four Sets of Fusions

# of mice	ELISA-positive hybridomas	Cell surface positive Hybridomas
31	895	260

Table 2. Summary of initial set of data with anti-CD40 IgG1 antibodies

Mother Hybridoma	Hybridoma clones	cell surface binding	Antagonist	ADCC	CDC	CMCCF	V-region DNA sequence
	131.2F5.8.5.1	+++	++	ND	ND	ND	
131.2F5	131.2F5.8.5.9	+++	+++	++	-	12047	Yes
	131.2F5.8.5.11	+++	+++	++	-	12055	Yes
	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	Yes
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	Yes
	155.2C2B9F12.2.10.4	+++	+/-	ND	ND	12064	
155.2C2	155.2C2B9F12.2.10.5	+++	ND	ND	ND	12065	
	155.2C2B9F12.2.10.6	+/-	ND	ND	ND	12066	
	166.5B6G12.1	+++	ND	ND	ND	12069	
166.5B6	166.5B6G12.3	+++	ND	ND	ND	12070	
	166.5B6G12.4	+++	+	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	
	185.3B4F12.5.6	+++	ND	ND	ND	12072	
185.3B4	185.3B4F12.5.11	+++	ND	ND	ND	12073	
	185.3B4F12.5.12	+++	+	ND	ND	12074	
	185.1A9B9.6.1	+	ND	ND	ND	ND	
185.1A9	185.1A9B9.6.6	+++	+++	+	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 from 7 mother hybridomas were identified to have antagonist activity. Based on their relative antagonist potency and ADCC activities, two hybridoma clones were selected. Their names are: 131.2F8.5.9 (5.9) and 153.8E2.D10.D6.12.12 (12.12).

Clones from 7 other hybridomas were identified as having antagonist activity (Table 2 above). Based on their relative antagonistic potency and ADCC activities, two hybridoma clones were selected for further evaluation. They are named 131.2F8.5.9 (5.9) and 153.8E2.D10.D6.12.12 (12.12). The binding profile of these two antibodies to CD40+ lymphoma cell line is shown as a flow cytometric histogram in Figure 1.

Example 2: Polynucleotide and Amino Acid Sequences of Human Anti-CD40 Antibodies

The cDNAs encoding the variable regions of the candidate antibodies were amplified by PCR, cloned, and sequenced. The amino acid sequences for the light chain and heavy chain of the CHIR-12.12 antibody are set forth in Figures 9A and 9B, respectively. See also SEQ ID NO:2 (light chain for mAb CHIR-12.12) and SEQ ID NO:4 (heavy chain for mAb CHIR-12.12). A variant of the heavy chain for mAb CHIR-12.12 is shown in Figure 9B (see also SEQ ID NO:5), which differs from SEQ ID NO:4 in having a serine residue substituted for the alanine residue at position 153 of SEQ ID NO:4. The nucleotide sequences encoding the light chain and heavy chain of the CHIR-12.12 antibody are set forth in Figures 10A and 10B, respectively. See also SEQ ID NO:1 (coding sequence for light chain for mAb CHIR-12.12) and SEQ ID NO:3 (coding sequence for heavy chain for mAb CHIR-12.12). The amino acid sequences for the light chain and heavy chain of the CHIR-5.9 antibody are set forth in Figures 11A and 11B, respectively. See also SEQ ID NO:6 (light chain for mAb CHIR-5.9) and SEQ ID NO:7 (heavy chain for mAb CHIR-5.9). A variant of the heavy chain for mAb CHIR-5.9 is shown in Figure 11B (see also SEQ ID NO:8), which differs from SEQ ID NO:7 in having a serine residue substituted for the alanine residue at position 158 of SEQ ID NO:7.

As expected for antibodies derived from independent hybridomas, there is substantial variation in the nucleotide sequences in the complementarity determining regions (CDRs). The diversity in the CDR3 region of V_H is believed to most significantly determine antibody specificity.

Example 3: Effect of CHIR-5.9 and CHIR-12.12 on the CD40/CD40L Interaction *In vitro*

The candidate antibodies CHIR-5.9 and CHIR-12.12 prevent the binding of CD40 ligand to cell surface CD40 and displace the pre-bound CD40 ligand. Antibodies CHIR-5.9 and CHIR-12.12 were tested for their ability to prevent CD40-ligand binding to CD40 on the surface of a lymphoma cell line (Ramos). Binding of both antibodies (unlabeled) prevented the subsequent binding of PE-CD40 ligand as measured by flow cytometric assays (Figure 2A). In a second set of assays the two antibodies were tested for their ability to replace CD40 ligand pre-bound to cell surface CD40. Both antibodies were effective for competing out pre-bound CD40 ligand, with CHIR-5.9 being slightly more effective than CHIR-12.12 (Figure 2B).

Example 4: CHIR-5.9 and CHIR-12.12 Bind to a Different Epitope on CD40 Than 15B8

The candidate monoclonal antibodies CHIR-5.9 and CHIR-12.12 compete with each other for binding to CD40 but not with 15B8, an IgG_2 anti-CD40 mAb (see International Publication No. WO 02/28904). Antibody competition binding studies using Biacore were designed using CM5 biosensor chips with protein A immobilized via amine coupling, which was used to capture either anti-CD40, CHIR-12.12, or 15B8. Normal association/dissociation binding curves are observed with varying concentrations of CD40-his (data not shown). For competition studies, either CHIR-12.12 or 15B8 were captured onto the protein A surface. Subsequently a CD40-his /CHIR-5.9 Fab complex (100 nM CD40:1 μM CHIR-5.9 Fab), at varying concentrations, was flowed across the modified surface. In the case of CHIR-12.12, there was no association of the complex observed, indicating CHIR-5.9 blocks binding of CHIR-12.12 to CD40-his. For 15B8, association of the Fab CHIR-5.9 complex was observed indicating CHIR-5.9 does not block binding of 15B8 to CD40 binding site. However, the off rate of the complex dramatically increased (data not shown).

It has also been determined that 15B8 and CHIR-12.12 do not compete for CD40-his binding. This experiment was set up by capturing CHIR-12.12 on the protein A biosensor chip, blocking residual protein A sites with control $hIgG_1$, binding CD40-his

and then flowing 15B8 over the modified surface. 15B8 did bind under these conditions indicating CHIR-12.12 does not block 15B8 from binding to CD40.

Example 5: Binding Properties of Selected Hybridomas

Protein A was immobilized onto CM5 biosensor chips via amine coupling. Human anti-CD40 monoclonal antibodies, at 1.5 μg/ml, were captured onto the modified biosensor surface for 1.5 minutes at 10 μl/min. Recombinant soluble CD40-his was flowed over the biosensor surface at varying concentrations. Antibody and antigen were diluted in 0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20 (HBS-EP). Kinetic and affinity constants were determined using the Biaevaluation software with a 1:1 interaction model/global fit.

As shown in Table 3 below, there is 121-fold difference in the off rate of CHIR-5.9 and CHIR-12.12 resulting in 24-fold higher affinity for CHIR-12.12.

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

Example 6: CHIR-5.9 and CHIR-12.12 are Potent Antagonists for CD40-Mediated Proliferation of Human Lymphocytes from Normal Subjects

Engagement of CD40 by CD40 ligand induces proliferation of human B cells. An antagonist anti-CD40 antibody is expected to inhibit this proliferation. Two candidate antibodies (CHIR-5.9 and CHIR-12.12) were tested for their ability to inhibit CD40 ligand-induced proliferation of PBMC from normal human subjects. Formaldehyde-fixed CHO cells transfectant-expressing CD40 ligand (CD40L) were used as a source of CD40

ligand. Human PBMC were cultured for 4 days with the formaldehyde-fixed CHO cells expressing CD40-ligand in the presence of varying concentrations of anti-CD40 mAb CHIR-5.9 or CHIR-12.12. The proliferation was measured by tritiated-thymidine incorporation. Cells were pulsed with tritiated-labeled thymidine at 37°C for 14-18 hours.

Both antibodies were found to be very effective for inhibiting CD40 ligand-induced proliferation of human PBMC (Table 4A, mAb CHIR-5.9, Table 4B, mAb CHIR-12.12). The experiment was performed with multiple donors of PBMC (n=12 for CHIR-5.9 and n=2 for CHIR-12.12) to ensure that the observed inhibition was not a peculiarity of cells from a single donor. Follow-up assessments with 4 additional donors of PBMC were carried out for mAb CHIR-12.12 with similar trends observed. A wide range of antibody concentrations (0.01 μg/ml to 100 μg/ml) was used in these assays. Nearly complete inhibition of CD40 ligand-induced proliferation could be achieved at 0.1 μg/ml concentration of antibodies in most cases. Antibody concentration (pM) to inhibit 50% of CD-40 ligand-induced lymphocyte proliferation (IC50) for lymphocytes from 6 donors yielded an average IC50 (pM) of 47 (SD=21; donor 1, 24; donor 2, 66; donor 3, 45; donor 4, 84; donor 5, 30; donor 6, 35), which compares favorably with the average IC50 (pM) of 49.65 shown in Table 4B. Based on the current data set, both candidate antibodies seem similar in their potency for inhibition of CD40 ligand-induced proliferation of normal PBMC.

Table 4A. Effect of mAb CHIR-5.9 on CD40L-induced PBMC proliferation.

Exp#		PBMC alone	CHO-CD40L alone	PBMC+ CHO-CD40L	Abs Conc (µg/ml)	huIgG1		CHIR-5.9	
						CPM	% of Inhibition	CPM	% of Inhibition
PBMC-010		1851	121	4436	1	5060	-26	2822	74
		1851	121	4436	0.25	5496	-43	2907	62
		1851	121	4436	0.0625	6029	-65	2619	74
		1851	121	4436	0.0156	5614	-56	1189	131
PBMC-011	Donor#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
	Donor#2	2216	294	7873	10	16879	-164	2382	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
	Donor#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
	Donor#4	4552	133	15301	10	22098	-64	3766	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	9399	-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	Donor#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
	Donor#2	3680	175	15145	100	21452	-56	1792	118
		3680	175	15145	20	16996	-16	1779	118
		3680	175	15145	4	17729	-23	1965	117
		3680	175	15145	0.8	17245	-19	2217	115
	Donor#3	2734	152	19775	100	22967	-19	1664	107
		2734	152	19775	20	21224	-9	1648	108
		2734	152	19775	4	20656	-5	1534	108
		2734	152	19775	0.8	18923	5	1282	110
PBMC-016		1118	36	13531	0.1	10928	21	745	103
		1118	36	13531	0.05	11467	17	982	102
		1118	36	13531	0.01	11942	13	3013	85
PBMC-017		982	75	12510	1	13597	-9	258	107

Table 4A: Effect of mAb CHIR-5.9 on CD40L-induced PBMC proliferation (cont.).

Average % inhibition of human PBMC at 100 μg/ml	-42	107
Average % inhibition of human PBMC at 10 μg/ml	-69	98
Average % inhibition of human PBMC at 1 μg/ml	-41	107
Average % inhibition of human PBMC at 0.1 μg/ml	-28	117
Average % inhibition of human PBMC at 0.01 μg/ml	-44	64
Average % inhibition of human PBMC	-35	101

% of inhibition:

100-(CPM with Abs-PBMC alone-CHO-CD40L alone)/(CPM of PBMC+CHO-CD40L-PBMC alone-CHO-CD40L alone)*100%

Table 4B. Effect of mAb CHIR-12.12 on CD40L-induced PBMC proliferation.

Expt#		PBMC alone	CHO-CD40L alone	PBMC+ CHO-CD40L	Abs Conc (µg/ml)	HuIgG1 CPM	HuIgG1 % of Inhibition	CHIR-12.12 CPM	CHIR-12.12 % of Inhibition	IC50(nM)
PBMC-025	Donor#1	4051	32	42292	0.1	33354	23	440	110	
		4051	32	42292	0.01	37129	14	8696	88	
		4051	32	42292	0.001	40271	5	32675	25	
		4051	32	42292	0.0001	40034	6	37261	13	24.22
	Donor#2	2260	31	14967	0.1	15767	-6	365	115	
		2260	31	14967	0.01	17134	-17	6734	65	
		2260	31	14967	0.001	20142	-41	16183	-9	
		2260	31	14967	0.0001	17847	-23	16187	-9	65.96
PBMC-026	Donor#1	2039	35	19071	0.1	17136	11	624	109	
		2039	35	19071	0.01	16445	15	6455	74	
		2039	35	19071	0.001	16195	17	17833	7	
		2039	35	19071	0.0001	16192	5	17924	7	45
	Donor#2	2016	64	17834	0.1	17181	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	18569	-5	84
PBMC-028	Donor#1	4288	45	22547	1	18204	24	2098	112	
		4288	45	22547	0.1	20679	10	1827	114	
		4288	45	22547	0.01	22799	-1	6520	88	
		4288	45	22547	0.001	23547	-5	22327	1	
		4288	45	22547	0.0001	24778	-12	24124	-9	30.07
	Donor#2	2148	58	54894	1	48545	12	5199	94	
		2148	58	54894	0.1	45708	17	5091	95	
		2148	58	54894	0.01	51741	6	18690	66	
		2148	58	54894	0.001	52421	5	50978	7	
		2148	58	54894	0.0001	54778	0	52581	4	34.68
PBMC-029	Donor#1	609	69	10054	0.1	11027	-10	2098	85	
		609	69	10054	0.01	10037	0	1827	88	
		609	69	10054	0.001	10222	-2	6520	36	
		609	69	10054	0.0001	11267	-13	22327	-131	28.06
	Donor#2	7737	57	23132	0.1	21254	12	2536	134	
		7737	57	23132	0.01	21726	9	10249	84	
		7737	57	23132	0.001	22579	4	23380	-2	
		7737	57	23132	0.0001	22491	4	23183	0	55.35
PBMC-030	Donor#1	2739	47	53426	0.1	60116	-13	2132	101	
		2739	47	53426	0.01	56411	-6	14297	77	
		2739	47	53426	0.001	59167	-11	55868	-5	
		2739	47	53426	0.0001	59290	-12	60865	-15	35.52
	Donor#2	4310	50	53781	0.1	52881	2	3206	102	
		4310	50	53781	0.01	51741	4	30716	47	
		4310	50	53781	0.001	53072	1	53628	0	
		4310	50	53781	0.0001	58045	-9	54343	-1	102.88
PBMC-032	Donor#1	2458	42	14058	0.1	16579	-22	636	116	40.36
		2458	42	14058	0.01	19250	-45	3358	93	

	2458	42	14058	0.001	19852	-50	20639	-57	
	2458	42	14058	0.0001	19161	-44	18907	-42	
Average % inhibition of human PBMC at 0.1 μg/ml						3		107	
Average % inhibition of human PBMC at 0.01 μg/ml						-1		74	
Average % inhibition of human PBMC at 0.001 μg/ml						-7		0	
Average % inhibition of human PBMC at 0.0001μg/ml						-8		-17	49.65
% of inhibition: 100-(CPM with Abs-PBMC alone-CHO-CD40L alone)/(CPM of PBMC+CHO-CD40L-PBMC alone-CHO-CD40L alone)*100%									

In addition to B cells, human PBMC also contain natural killer cells that can mediate antibody dependent cytotoxicity (ADCC). To clarify the mechanism of antibody-mediated inhibition of proliferation, assays were performed with B cells purified from human PBMC. Similar to results obtained with PBMC, both antibodies potently inhibited the CD40 ligand-induced proliferation of purified B cells (Table 5, n=3). These data demonstrate that the antagonist activity of the candidate antibodies, and not the mechanism of ADCC, is the cause of proliferation inhibition in these assays.

Table 5. Effect of anti-CD40 antibodies on CD40 ligand-induced proliferation of purified human B cells

		CPM				HuIgG1		CHIR-5.9		CHIR-12.12	
Exp#	Donor #	B cells	CHO-CD40L	B cells + CHO-CD40L	Abs Conc(μg/ml)	CPM	% Inhibition	CPM	% Inhibition	CPM	% Inhibition
B cell-004	1	418	89	3132	100	429	103	271	109	132	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	6334	-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
B cell-005	3	267	75	24552	1	25910	-6	291	100	102	101
		267	75	24552	0.1	28447	-16	259	100	108	101
		267	75	24552	0.01	26706	-9	2957	89	4922	81
Average % inhibition							-3		103		103

% of inhibition: 100-(CPM with Abs-B cells alone-CHO-CD40L alone)/(CPM of B cell with CHO-CD40L-B cells alone-CHO-CD40L alone)*100%

Example 7: CHIR-5.9 and CHIR-12.12 Do Not Induce Strong Proliferation of Human B Cells from Normal Subjects

CD40 ligand activates normal B cells and B-cell lymphoma cells to proliferate. Binding of some anti-CD40 antibodies (agonist) can provide a similar stimulatory signal

for the proliferation of normal and cancer B cells. Antibodies with strong B cell stimulatory activity are not suitable candidates for therapeutic treatment of B cell lymphomas. The two candidate antibodies were tested for their ability to induce proliferation of B cells from normal volunteer donors. The B cells purified by Ficoll-Hypaque Plus gradient centrifugation from normal donor PBMC were cultured in 96-well plates with varying concentrations of candidate antibodies (range of 0.001 to 100 μg/ml) for a total of 4 days. In the positive control group, PBMC were cultured with formaldehyde-fixed CHO cells expressing CD40-ligand. The B cell proliferation was measured by incorporation of tritiated-labeled thymidine at 37°C for 14-18 hours. While the CD40 ligand presented on CHO cells induced vigorous proliferation of B cells resulting in an average stimulation index (SI) of 145, the candidate antibodies induced only a weak proliferation with a stimulation index of 2.89 and 5.08 for CHIR-12.12 and CHIR-5.9, respectively (n=3) (Table 6).

Table 6. Proliferation of B cells purified from normal human subjects in response to candidate anti-CD40 mAbs

Exp#	Donor#	B cells	Bcells+CHO-CD40L		Abs conc (μg/ml)	B cells+huIgG1		B cells+CHIR-5.9		B cells+CHIR-12.12	
		CPM	CPM	S. Index(1)		CPM	S. Index(2)	CPM	S. Index (2)	CPM	S. Index(2)
B cell-004	1	418	3132	7.49	100	498	1.19	401	0.96	458	1.10
Frozen		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
Frozen	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
B cell-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
Average Stimulation Index (SI)				145.25			1.29		5.08		2.88

S. index(1): = CPM (B cells+CHO-CD40L)/CPM (B cells alone)
S. index(2): = CPM (B cells+Abs)/CPM (PBMC alone)

In addition to B cells, human PBMC contain cell types that bear Fc receptors (FcR) for IgG1 molecules that can provide cross linking of anti-CD40 antibodies bound to CD40 on B cells. This cross-linking could potentially enhance stimulatory activity of anti-CD40 antibodies. To confirm the lack of B cell stimulatory activity of CHIR-5.9 and

CHIR-12.12 antibodies in the presence of cross-linking cells, proliferation experiments were performed with total PBMC containing B cells as well as FcR+ cells. Data from these experiments (Table 7A, mAb CHIR-5.9; Table 7B, mAb CHIR-12.12) confirm that these candidate antibodies even in the presence of FcR-bearing cells in general do not stimulate B cells to proliferate over background proliferation induced by control human IgG1 (n=10). The CD40 ligand induced an average stimulation index (SI) SI of 7.41. The average SI with candidate antibodies were 0.55 and 1.05 for CHIR-12.12 and CHIR-5.9, respectively. Only one of the 10 donor PBMC tested showed some stimulatory response to CHIR-5.9 antibody (donor #2 in Table 7). The lack of stimulatory activity by candidate mAbs was further confirmed by measuring the PBMC proliferation in response to candidate anti-CD40 antibodies immobilized on the plastic

Table 7A. Proliferation of PBMC from normal human subjects in response to mAb CHIR-5.9.

Exp#		PBMC	PBMC+CHO-CD40L CPM	index(1)	Abs conc (µg/ml)	PBMC+huIgG1 CPM	index(2)	PBMC+CHIR-5.9 CPM	index(2)
PBMC-010		1417	5279	3.73	1	1218	0.86	5973	4.22
		1417	5279		0.25	1712	1.21	4815	3.40
		1417	5279		0.0625	1449	1.02	3642	2.57
		1417	5279		0.0156	1194	0.84	3242	2.29
PBMC-011	Donor#1	2136	8247	3.86	10	3047	1.43	3177	1.49
		2136	8247		1	2726	1.28	3617	1.69
		2136	8247		0.1	2026	0.95	2011	0.94
		2136	8247		0.01	2424	1.13	1860	0.87
	Donor#2	2374	11561	4.87	10	4966	2.09	4523	1.91
		2374	11561		1	2544	1.07	2445	1.03
		2374	11561		0.1	2177	0.92	1462	0.62
		2374	11561		0.01	4672	1.97	1896	0.80
	Donor#3	3229	7956	2.46	10	5035	1.56	2119	0.66
		3229	7956		1	2826	0.88	1099	0.34
		3229	7956		0.1	2277	0.71	1052	0.33
		3229	7956		0.01	3078	0.95	1899	0.59
	Donor#4	4198	14314	3.41	10	5012	1.19	5176	1.23
		4198	14314		1	3592	0.86	4702	1.12
		4198	14314		0.1	5298	1.26	4319	1.03
		4198	14314		0.01	5758	1.37	5400	1.29
PBMC-014		2350	8787	3.74	100	2722	1.16	2471	1.05
		2350	8787		20	2315	0.99	2447	1.04
		2350	8787		4	2160	0.92	1659	0.71
		2350	8787		0.8	2328	0.99	1671	0.71
PBMC-015	Donor#1	3284	12936	3.94	100	3598	1.10	1682	0.51
		3284	12936		20	2751	0.84	1562	0.48
		3284	12936		4	3135	0.95	1105	0.34
		3284	12936		0.8	4027	1.23	1419	0.43
	Donor#2	6099	19121	3.14	100	2999	0.49	5104	0.84

		1912 6099 1		20	4025	0.66	391 7	0.64
		1912 6099 1		4	4498	0.74	334 1	0.55
		1912 6099 1		0.8	3834	0.63	413 9	0.68
	Donor#3	1982 2479 6	8.99	100	3564	1.44	120 4	0.49
		1982 2479 6		20	1674	0.76	782	0.32
		1982 2479 6		4	1779	0.72	634	0.26
		1982 2479 6		0.8	2274	0.92	937	0.38
PBMC-016		1578 1148 9	13.75	0.1	1255	1.09	103 6	0.90
		1578 1148 9		0.05	1284	1.12	871	0.76
		1578 1148 9		0.01	1446	1.26	952	0.83
Average SI of PBMC			5.89			1.06		1.03

Index(1): =(PBMC+CHO-CD40L)/PBMC

Index(2): =(PBMC+Abs)/PBMC

Table 7B. Proliferation of PBMC from normal human subjects in response to mAb CHIR-12.12.

Exp#		PBMC	PBMC+CHO-CD40L CPM	PBMC+CHO-CD40L Index(1)	Abs conc (μg/ml)	PBMC+huIgG1 CPM	PBMC+huIgG1 Index(2)	PBMC+CHIR-12.12 CPM	PBMC+CHIR-12.12 Index(2)
PBMC-025	Donor#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	8060	1.99	8762	2.17
		4051	42292		0.0001	4351	1.07	4342	1.07
	Donor#2	2260	14967	6.63	0.1	2538	1.12	6741	2.98
		2260	14967		0.01	3524	1.56	8921	3.95
		2260	14967		0.001	3159	1.40	4484	1.98
		2260	14967		0.0001	2801	1.24	2533	1.12
PBMC-026	Donor#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	3283	1.85
		2085	18313		0.0001	1709	0.82	1768	0.85
	Donor#2	676	18054	26.71	0.1	660	0.98	2229	3.30
		676	18054		0.01	2884	4.34	1238	1.83
		676	18054		0.001	993	1.63	1507	2.23
		676	18054		0.0001	984	1.46	811	1.20
PBMC-027	Donor#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	3218	1.17	3501	1.28
		2742	13028		0.0001	5107	1.86	4272	1.56
	Donor#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	Donor#1	4288	22547	5.26	0.1	3888	0.86	2525	0.59
		4288	22547		0.01	3113	0.73	2047	0.48

		4288	22547		0.001	4414	1.83	3515	0.82
		4288	22547		0.0001	2452	0.57	4189	0.98
	Donor#2	2148	54894	25.56	0.1	9127	4.25	5574	2.59
		2148	54894		0.01	4586	2.13	6515	3.03
		2148	54894		0.001	5285	2.46	5919	2.76
		2148	54894		0.0001	4667	2.17	4298	2.00
PBMC-029	Donor#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
	Donor#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	Donor#1	4164	57205	13.74	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
	Donor#2	3324	53865	16.20	10	6376	1.92	4731	1.42
		3324	53865		1	4720	1.42	5219	1.57
		3324	53865		0.1	3880	1.17	5869	1.77
		3324	53865		0.01	3863	1.16	5657	1.70
PBMC-032	Donor#1	1808	15271	8.45	10	2349	1.30	4790	2.65
		1808	15271		1	3820	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
Average SI of PBMC				11.92			1.30		1.62

Index(1): =CPM of (PBMC+CHO-CD40L)/CPM of PBMC
Index(2): =CPM of (PBMC+Abs)/CPM of PBMC

surface of the culture wells (n=2). The average SI with CD40 ligand, CHIR-12.12, and CHIR-5.9 stimulation were 22, 0.67, and 1.2, respectively (Table 8). Taken together these data show that the candidate antiCD40 antibodies do not possess strong B cell stimulatory properties.

Table 8. Proliferation of PBMC from normal human subjects in response to immobilized anti-CD40 antibodies

	PBMC	PBMC+CHO-CD40L		Abs conc	PBMC+huIgG1		PBMC+CHIR-5.9		PBMC+CHIR-12.12	
Exp#	CPM	CPM	S.Index (1)	(ug/ml)	CPM	S. Index(2)	CPM	S.Index (2)	CPM	S.Index (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
Immobline-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

Average Stimulation Index	**21.96**	**0.81**	**1.21**	**0.67**

S. index (1): = CPM (PBMC+CHO-CD40L)/CPM (PBMC)
S. index (2): = CPM (PBMC+mAbs)/CPM (PBMC)

Example 8: CHIR-5.9 and CHIR-12.12 Are Able to Kill CD40-Bearing Target Cells by ADCC

The candidate antibodies can kill CD40-bearing target cells (lymphoma lines) by the mechanism of ADCC. Both CHIR-5.9 and CHIR-12.12 are fully human antibodies of IgG1 isotype and are expected to have the ability to induce the killing of target cells by the mechanism of ADCC. They were tested for their ability to kill cancer cell lines in *in vitro* assays. Two human lymphoma cell lines (Ramos and Daudi) were selected as target cells for these assays. PBMC or enriched NK cells from 8 normal volunteer donors were used as effector cells in these assays. A more potent ADCC response was observed with CHIR-12.12 compared with CHIR-5.9 against both the lymphoma cancer cell line target cells. Lymphoma cell lines also express CD20, the target antigen for rituximab (Rituxan®), which allowed for comparison of the ADCC activity of these two candidate mAbs with rituximab ADCC activity. For lymphoma cell line target, an average specific lysis of 35%, 59%, and 47% was observed for CHIR-5.9, CHIR-12.12, and rituximab respectively when used at 1 μg/ml concentration (Table 9). The two antibodies did not show much activity in complement dependent cytotoxicity (CDC) assays.

Table 9. Anti-CD40 mAB dependent killing of lymphoma cell lines by ADCC.

Anti-CD40 mAb dependent killing of lymphoma cell lines by ADCC										
			Target cells : Human lymphoma cell.line (Ramos or Daudi)							
					CHIR-5.9		CHIR-12.12		Rituxan	
Expt	Effector cell	E:T ratio	% lysis IgG1	Abs conc(μg/ml)	% lysis	% lysis - % lysis IgG1	% lysis	% lysis-% lysis IgG1	% lysis	% lysis-% lysis 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	3.60	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	-14.60	-3.60	39.62	50.62	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	63.88	97.70	95.38	66.2	63.88
Calcein AM			0.48	1	67.20	66.72	123.00	122.52	66.2	65.72
			-1.43	0.2	78.40	79.83	118.00	119.43	66.8	68.23
			3.39	0.04	69.10	65.71	109.00	105.61	64.9	61.51
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	46.80	42.22	14.68	10.10
			5.41	0.002	6.35	0.94	5.10	-0.31	9.58	4.16
			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	43.89	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	27.16	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
Average % lysis at 1 μg/ml concentration of mAbs						35.31		59.03		47.23
* The greater than 100% killing are due to incomplete killing by detergent used for 100% killing control.										

Example 9: CD40 Is Present on the Surface of NHL Cells from Lymph Node Biopsy

Patients

NHL cells were isolated from biopsied lymph nodes from patients and were preserved in liquid nitrogen until use. Cell viability at the time of analysis exceeded

90%. The cells from two rituximab-sensitive and three rituximab-resistant patients (five patients in total) were stained with either a direct labeled 15B8-FITC or 15B8 plus anti-huIgG$_2$-FITC and analyzed by Flow cytometry. NHL cells from all the patients were found to express CD40. Table 10 shows that an average of 76% of NHL cells express CD40 (a range of 60-91%).

Table 10.

Patient ID [a]	Patient type [b]	% positive [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
Average % positive		*76*	

[a] NHL patients treated with anti-CD20 mAb
[b] patient response to anti- CD20 mAb; CR=complete responder; NR=nonresponder
[c] % of cells in lymphocyte gate that stain positive
[d] MS81, agonist anti-CD40 mAb
[e] 15B8, antagonist anti-CD40 Mab
[f] n.d., not done

Example 10: CHIR-5.9 and CHIR-12.12 Do Not Stimulate Proliferation of Cancer Cells from the Lymph Nodes of NHL Patients

CD40 ligand is known to provide a stimulatory signal for the survival and proliferation of lymphoma cells from NHL patients. Binding of some anti-CD40 antibodies (agonist) can provide a similar stimulatory signal for the proliferation of patient cancer cells. Antibodies with strong B cell stimulatory activity are not suitable candidate for therapeutic treatment of B cell lymphomas. The two candidate antibodies were tested for their ability to induce proliferation of NHL cells from 3 patients. The cells isolated from lymph node (LN) biopsies were cultured with varying concentrations of candidate antibodies (range of 0.01 to 300 μg/ml) for a total of 3 days. The cell proliferation was measured by incorporation of tritiated thymidine. Neither of the two candidate mAbs induced any proliferation of cancer cells at any concentration tested (Table 11). Antibodies even in the presence of exogenously added IL-4, a B cell growth

factor, did not induce proliferation of NHL cells (tested in one of the thee patient cells. These results indicate that CHIR-5.9 and CHIR-12.12 are not agonist anti-CD40 antibodies and do not stimulate proliferation *in vitro* of NHL cells from patients.

Table 11. Proliferation of cancer cells from LN of NHL patients in response to candidate anti-CD40 mAbs

Donor#	Abs conc(ug/ml)	CPM Cells + IgG1	CPM cells + CHIR-5.9	S. index CHIR-5.9	CPM cells + CHIR-12.12	S. index CHIR-12.12	CPM cells +M881	S. index M881
PP	0.01	180	203	1.13	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

Example 11: CHIR-5.9 and CHIR-12.12 Can Block CD40 Ligand-Mediated Proliferation of Cancer Cells from Non-Hodgkin's Lymphoma Patients

Engagement of CD40 by CD40 ligand induces proliferation of cancer cells from NHL patients. An antagonist anti-CD40 antibody is expected to inhibit this proliferation. The two candidate anti-CD40 antibodies were tested at varying concentrations (0.01 μg /ml to 100 μg /ml) for their ability to inhibit CD40 ligand-induced proliferation of NHL cells from patients. NHL cells from patients were cultured in suspension over CD40L-expressing feeder in the presence of IL-4. The NHL cell proliferation was measured by ^{3}H-thymidine incorporation. Both antibodies were found to be very effective for

inhibiting CD40 ligand-induced proliferation of NHL cells (Table 12, n=2). Nearly complete inhibition of CD40 ligand-induced proliferation could be achieved at 1.0 to 10 μg/ml concentration of antibodies.

Table 12. Inhibition of CD40 ligand-induced proliferation of cancer cells from the LN of NHL patients.

Patient	Abs Conc (ug/ml)	CPM	CHIR-5.9		CHIR-12.12		Rituximab	
		IgG1	CPM	% Inhibition	CPM	% Inhibition	CPM	% Inhibition
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

% inhibition: 100-(CPM with test Abs/CPM with control mAb) *100%

Example 12: Effect of CHIR-5.9 on Number of Viable NHL Cells When Cultured with CD40-Ligand Bearing Cells

Effects of CHIR-5.9 on the viable NHL cell numbers when cultured with CD40-ligand bearing cells over an extended period of time (days 7, 10, and 14) were investigated. CD40 ligand-mediated signaling through CD40 is important for B cell survival. This set of experiments evaluated the effect of anti-CD40 antibodies on NHL cell numbers at days 7, 10, and 14. NHL cells from five patients were cultured in suspension over CD40L-expressing irradiated feeder cells in the presence of IL-4. The control human IgG and CHIR-5.9 antibodies were added at concentrations of 10 μg/ml at day 0 and day 7. The viable cells under each condition were counted on the specified day. Cell numbers in the control group (IgG) increased with time as expected. Reduced numbers of cells were recovered from CHIR-5.9-treated cultures compared to control group. The greatest levels of reduction in cell numbers by CHIR-5.9 antibody were observed at day 14 and were on average 80.5% (a range of 49-94%) compared to isotype control (n=5). These data are summarized in Table 13.

Table 13. Effect of anti-CD40 antibody (CHIR-5.9/5.11) on NHL patient cell numbers over prolonged culture period (day 7, 10, and 14)

Patient	Days in culture	Viable cell numbers		% reduction
		IgG	mAb CHIR-5.9/5.11	compared to IgG control
PS	0	100000	1000000	0.00
	7	935000	447500	52.14
	10	127090	504100	60.34
	14	102910	525000	48.98
MT	0	100000	1000000	0.00
	7	267600	182500	31.80
	10	683400	191600	71.96
	14	145000	225000	84.48
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

* % reduction compare to ctrl Abs=100-(test Abs/ctrl Abs)*100

Example 13: CHIR-5.9 and CHIR-12.12 Are Able to Kill Cancer Cells from the Lymph Nodes of NHL Patients by ADCC

Both CHIR-5.9 and CHIR-12.12 are fully human antibodies of IgG_1 isotype and were shown to induce the killing of lymphoma cell lines *in vitro* by the mechanism of ADCC (Table 9). They were tested for their ability to kill cancer cells from a single NHL patient in *in vitro* assays. Enriched NK cells from normal volunteer donor either fresh after isolation or after culturing overnight at 37°C were used as effector cells in this assay. Similar results were obtained with both freshly isolated NK cells and NK cells

used after overnight culture. The higher level of ADCC was observed with CHIR-12.12 compared with CHIR-5.9 against the NHL cells from the patient. NHL cells also express CD20, the target antigen for rituximab (Rituxan®), which allowed for comparison of the ADCC activity of these two candidate mAbs with rituximab. Antibody CHIR-12.12 and rituximab show similar level of ADCC activity with CHIR-5.9 scoring lower in this assay. These data are shown in Figures 3A and 3B.

Example 14: CHIR-5.9 and CHIR-12.12 Can Block CD40-Mediated Survival and Proliferation of Cancer Cells from CLL Patients

The candidate antibodies can block CD40-mediated survival and proliferation of cancer cells from CLL patients. CLL cells from patients were cultured in suspension over CD40L-expressing formaldehyde-fixed CHO cells under two different conditions: addition of human isotype antibody IgG (control); and addition of either CHIR-5.9 or CHIR-12.12 monoclonal antibody. All antibodies were added at concentrations of 1, 10, and 100 μg/mL in the absence of IL-4. The cell counts were performed at 24 and 48 h by MTS assay. Reduced numbers of cells were recovered from CHIR-5.9- (n=6) and CHIR-12.12- (n=2) treated cultures compared to control group. The greater differences in cell numbers between anti-CD40 mAb-treated and control antibody-treated cultures were seen at the 48-h time point. These data are summarized in Table 14.

Table 14. The effect of candidate antibodies on CD40-induced survival and proliferation of cancer cells from CLL patients measured at 48 h after the culture initiation

Patient#	Ab conc(μg/ml)	Relative cell numbers			% reduction in cell numbers*	
		IgG1	CHIR-5.9/5.11	CHIR-12.12	CHIR-5.9/5.11	CHIR-12.12
1	1	269.31	25.27	ND	90.62	ND
	10	101.58	33.07	ND	67.44	ND
	100	130.71	40.16	ND	69.28	ND
2	1	265.55	75.8	ND	71.46	ND
	10	227.57	128.5	ND	43.53	ND
	100	265.99	6.4	ND	97.59	ND
3	1	85.9	35.39	ND	58.80	ND
	10	70.44	39.51	ND	43.91	ND
	100	77.65	20.95	ND	73.02	ND
4	1	80.48	15.03	ND	81.32	ND
	10	63.01	19.51	ND	69.04	ND
	100	55.69	3.65	ND	93.45	ND
5	1	90.63	91.66	89.59	-1.14	1.15
	10	78.13	82.28	60.41	-5.31	22.68
	100	63.53	86.47	39.59	-36.11	37.68
6	1	130.21	77.6	71.88	40.40	44.89
	10	131.77	78.13	73.96	40.71	43.87
	100	127.08	76.56	82.29	39.75	35.25

* % reduction compared to control Abs=100-(test Abs/control Abs)*100

Example 15: CHIR-5.9 and CHIR-12.12 Show Anti-Tumor Activity in Animal Models

Pharmacology/in vivo efficacy

The candidate mAbs are expected to produce desired pharmacological effects to reduce tumor burden by either/both of two anti-tumor mechanisms, blockade of proliferation/survival signal and induction of ADCC. The currently available human lymphoma xenograft models use long-term lymphoma cell lines that, in contrast to primary cancer cells, do not depend on CD40 stimulation for their growth and survival.

Therefore the component of these mAbs' anti-tumor activity based on blocking the tumor proliferation/survival signal is not expected to contribute to anti-tumor efficacy in these models. The efficacy in these models is dependent on the ADCC, the second anti-tumor mechanism associated with the CHIR-5.9 and CHIR-12.12 mAbs. Two xenograft human lymphoma models based on Namalwa and Daudi cell lines were assessed for anti-tumor activities of candidate mAbs. To further demonstrate their therapeutic activity, these candidate mAbs were evaluated in an unstaged and staged xenograft human lymphoma model based on the Daudi cell line.

Summary of in vivo efficacy data

When administered intraperitoneally (i.p.) once a week for a total of 3 doses, CHIR-12.12, one of the two candidate mAbs, significantly inhibited the growth of aggressive unstaged B cell lymphoma (Namalwa) in a dose-dependent manner (Figure 4). The second candidate mAb, CHIR-5.9, was tested only at a single dose in this study and was less effective than CHIR-12.12 at the same dose. Interestingly, CHIR-12.12 was found to be more efficacious in this model than rituximab. It is possible that lower efficacy by rituximab could be due to low CD20 expression on the Namalwa lymphoma cell line. The efficacy observed with candidate mAbs has greater importance because only one of the two cancer cell killing mechanisms (ADCC) is operative in the current xenograft lymphoma model. Two killing mechanisms, ADCC and blocking of survival signal, are expected to contribute to anti-tumor activities in human lymphoma patients. This is likely to increase the chance of achieving efficacy in human lymphoma patients. The candidate anti-CD40 mAbs also showed a trend toward tumor growth inhibition in a second B cell lymphoma model (non-validated Daudi model, data not shown). In follow-up studies, the two candidate antibodies were shown to have dose-dependent anti-tumor efficacy in both the unstaged and staged Daudi lymphoma models (Figures 5 and 6, respectively). In the staged Daudi model, the CHIR-12.12 mAb was more efficacious at reducing tumor volume than was a similar dose of Rituxan®.

Xenograft human B cell Lymphoma models

To ensure consistent tumor growth, T cell-deficient nude mice were whole-body irradiated at 3 Gy to further suppress the immune system one day before tumor inoculation. Tumor cells were inoculated subcutaneously in the right flank at $5x10^6$ cells per mouse. Treatment was initiated either one day after tumor implantation (unstaged subcutaneous xenograft human B cell lymphoma models, Namalwa and Daudi) or when tumor volume reached 200-400 mm^3 (staged Daudi model, usually 15 days after tumor inoculation). Tumor-bearing mice were injected anti-CD40 mAbs intraperitoneally (i.p.) once a week at the indicated doses. Tumor volumes were recorded twice a week. When tumor volume in any group reached 2500 mm^3, the study was terminated. Note that in the staged Daudi model, tumor volume data was analyzed up to day 36 due to the death of some mice after that day. Complete regression (CR) was counted until the end of the study. Data were analyzed using ANOVA or Kruskal-Wallis test and corresponding post-test for multi-group comparison.

In the unstaged Namalwa model, anti-CD40 mAb CHIR-12.12, but not Rituxan® (rituximab), significantly ($p = <0.01$) inhibited the growth of Namalwa tumors (tumor volume reduction of 60% versus 25% for rituxamab, n=10 mice/group) (Figure 4). Thus, in this model, anti-CD40 mAb CHIR-12.12 was more potent than rituximab. It is noteworthy that the second candidate mAb, CHIR-5.9, was at least as efficacious as rituximab at a dose $1/10^{th}$ that of rituximab. Both anti-CD40 mAb CHIR-12.12 and rituxan significantly prevented tumor development in the unstaged Daudi tumor model (14/15 resistance to tumor challenge) (Figure 5).

When these anti-CD40 monoclonal antibodies were further compared in a staged xenograft Daudi model, in which treatment started when the subcutaneous tumor was palpable, anti-CD40 mAb CHIR-12.12 at 1 mg/kg caused significant tumor reduction ($p=0.003$) with 60% complete regression (6/10), while rituximab at the same dose did not significantly inhibit the tumor growth nor did it cause complete regression (0/10). See Figure 6.

In summary, the anti-CD40 mAb CHIR-12.12 significantly inhibited tumor growth in experimental lymphoma models. At the same dose and regimen, mAb CHIR-12.12 showed better anti-cancer activity than did Rituxan® (rituximab). Further, no

clinical sign of toxicity was observed at this dose and regimen. These data suggest that the anti-CD40 mAb CHIR-12.12 has potent anti-human lymphoma activity *in vitro* and in xenograft models and could be clinically effective for the treatment of lymphoma.

Example 16: Pharmacokinetics of CHIR-5.9 and CHIR-12.12

The pharmacokinetics of anti-CD40 mAb in mice was studied after single IV and IP dose administration. Anti-CD40 mAb exhibited high systemic bioavailability after IP administration, and prolonged terminal half-life (>5 days) (data not shown). This pilot study was conducted to aid in the design of pharmacology studies; however, it is of little to no importance for the development activity of this mAb since this fully human mAb does not cross react with mouse CD40.

Example 17: Characterization of Epitope for Monoclonal Antibodies CHIR-12.12 and CHIR-5.9

To determine the location of the epitope on CD40 recognized by monoclonal antibodies CHIR-12.12 and CHIR-5.9, SDS-PAGE and Western blot analysis were performed. Purified CD40 (0.5 μg) was separated on a 4-12% NUPAGE gel under reducing and non-reducing conditions, transferred to PVDF membranes, and probed with monoclonal antibodies at 10 μg/ml concentration. Blots were probed with alkaline phosphatase conjugated anti-human IgG and developed using the Western Blue^{R} stabilized substrate for alkaline phosphatase (Promega).

Results indicate that anti-CD40 monoclonal antibody CHIR-12.12 recognizes epitopes on both the non-reduced and reduced forms of CD40, with the non-reduced form of CD40 exhibiting greater intensity than the reduced form of CD40 (Table 15; blots not shown). The fact that recognition was positive for both forms of CD40 indicates that this antibody interacts with a conformational epitope part of which is a linear sequence. Monoclonal antibody CHIR-5.9 primarily recognizes the non-reduced form of CD40 suggesting that this antibody interacts with a primarily conformational epitope (Table 15; blots not shown).

Table 15. Domain identification.

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

To map the antigenic region on CD40, the four extracellular domains of CD40 were cloned and expressed in insect cells as GST fusion proteins. The secretion of the four domains was ensured with a GP67 secretion signal. Insect cell supernatant was analyzed by SDS-PAGE and western blot analysis to identify the domain containing the epitope.

Monoclonal antibody CHIR-12.12 recognizes an epitope on Domain 2 under both reducing and non-reducing conditions (Table 16; blots not shown). In contrast, monoclonal antibody CHIR-5.9 exhibits very weak recognition to Domain 2 (Table 16; blots not shown). Neither of these antibodies recognize Domains 1, 3, or 4 in this analysis.

Table 16. Domain 2 analysis.

	Reduced	Non-reduced
mAb CHIR-12.12	++	+++
mAb CHIR-5.9	+	+

To define more precisely the epitope recognized by mAb CHIR-12.12, peptides were synthesized from the extracellular Domain 2 of CD40, which corresponds to the sequence PCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICT (residues 61-104 of the sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12). SPOTs membranes (Sigma) containing thirty-five 10mer peptides with a 1-amino-acid offset were generated. Western blot analysis with mAb CHIR-12.12 and anti-human IgG beta-

galactosidase as secondary antibody was performed. The blot was stripped and reprobed with mAb CHIR-5.9 to determine the region recognized by this antibody

SPOTs analysis probing with anti-CD40 monoclonal antibody CHIR-12.12 at 10 µg/ml yielded positive reactions with spots 18 through 22. The sequence region covered by these peptides is shown in Table 17.

Table 17. Results of SPOTs analysis probing with anti-CD40 monoclonal antibody CHIR-12.12.

Spot Number	Sequence Region
18	HQHKYCDPNL (residues 78-87 of SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12)
19	QHKYCDPNLG (residues 79-88 of SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12)
20	HKYCDPNLGL (residues 80-89 of SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12)
21	KYCDPNLGLR (residues 81-90 of SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12)
22	YCDPNLGLRV (residues 82-91 of SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12)

These results correspond to a linear epitope of: YCDPNL (residues 82-87 of the sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12). This epitope contains Y82, D84, and N86, which have been predicted to be involved in the CD40-CD40 ligand interaction.

SPOTs analysis with mAb CHIR-5.9 showed a weak recognition of peptides represented by spots 20-22 shown in Table 18, suggesting involvement of the region YCDPNLGL (residues 82-89 of the sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12) in its binding to CD40. It should be noted that the mAbs CHIR-12.12 and CHIR-5.9 compete with each other for binding to CD40 in BIACORE analysis.

Table 18. Results of SPOTs analysis probing with anti-CD40 monoclonal antibody CHIR-5.9.

Spot Number	Sequence Region
20	HKYCDPNLGL (residues 80-89 of SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12)
21	KYCDPNLGLR (residues 81-90 of SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12)
22	YCDPNLGLRV (residues 82-91 of SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12)

The linear epitopes identified by the SPOTs analyses are within the CD40 B1 module. The sequence of the CD40 B1 module is:

HKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTIC (residues 80-103 of SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12).

Within the linear epitope identified for CHIR-12.12 is C83. It is known that this cysteine residue forms a disulphide bond with C103. It is likely that the conformational epitope of the CHIR-12.12 mAb contains this disulfide bond (C83-C103) and/or surrounding amino acids conformationally close to C103.

Example 18: Number of CD20 and CD40 Molecules on Namalwa and Daudi Cells

The number of CD20 and CD40 molecules on Namalwa and Daudi cells was determined as outlined in Figure 7, using antibody concentrations of 0.01, 0.1, 1, 10, and 100 μg/mL. As can be seen in Figure 7, the average number of CD20 molecules (target for rituximab) is greater on both the Namalwa and Daudi cell lines than is the number of CD40 molecules (target for mAb CHIR-12.12).

Example 19: ADCC of mAb CHIR-12.12 and Rituximab Against Daudi Lymphoma Cells

The rituximab and candidate mAb CHIR-12.12 were tested *in vitro* for ADCC activity at variable concentrations against lymphoma cell line Daudi as target (T) cells and purified NK cells from healthy human volunteers as effector (E) cells. Freshly

isolated human NK cells were mixed with calcein-labeled Daudi lymphoma cells at an E:T ratio of 10. The cell mixture was incubated for 4 hours at 37°C in the presence of the stated concentrations of either mAb CHIR-12.12 or rituximab. The calcein level released from lysed target cells in the supernatant was measured as Arbitrary Fluorescent Units (AFU). The percent specific lysis was calculated as: 100 x (AFU test – AFU spontaneous release)/(AFU maximal release – AFU spontaneous release), where AFU spontaneous release is the calcein released by target cells in the absence of antibody or NK cells, and AFU maximal release is the calcein released by target cells upon lysis by detergent.

Antibody concentration-dependent Daudi cell lysis was observed (Figure 8; Table 19 below). The maximum specific lysis of target lymphoma cells induced by anti-CD40 mAb was greater compared to the lysis induced by rituximab (63.6% versus 45.9%, n=6; paired *t* test of mAb CHIR-12.12 versus rituximab, p=0.0002). In addition, ED50 for rituximab was on average (n=6) 51.6 pM, 13-fold higher than ED50 for the anti-CD40 mAb CHIR-12.12 for this activity.

Table 19. Comparative ADCC of mAb CHIR-12.12 and rituximab against Daudi lymphoma cells.

NK Cell Donor	Maximal Killing (%)		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
Average	63.6	45.9	3.8	51.6

Example 20: CHIR-12.12 Blocks CD40L-Mediated CD40 Survival and Signaling Pathways in Normal Human B Cells

Soluble CD40 ligand (CD40L) activates B cells and induces various aspects of functional responses, including enhancement of survival and proliferation, and activation of NFκB, ERK/MAPK, PI3K/Akt, and p38 signaling pathways. In addition, CD40L-mediated CD40 stimulation provides survival signals by reduction of cleaved PARP and induction of the anti-apoptotic proteins, XIAP and Mcl-1, in normal B cells. CD40L-mediated CD40 stimulation also recruits TRAF2 and TRAF3 to bind CD40 cytoplasmic domain.

The following studies demonstrate that CHIR-12.12 directly inhibited all of these stimulation effects on normal human B cells. For example, CHIR-12.12 treatment resulted in increased cleavage of caspase-9, caspase-3, and PARP as well as reduction of XIAP and Mcl-1 in a time- and dose-dependent manner, restoring B cell apoptosis. Treatment with CHIR-12.12 also inhibited phosphorylation of IκB kinase (IKK) α and β (NFκB pathway), ERK, Akt, and p38 in response to CD40L-mediated CD40 stimulation. Further, it was found that CHIR-12.12 did not trigger these apoptotic effects without initial CD40L-mediated CD40 stimulation.

CHIR-12.12 inhibited survival mediated by CD40 ligand by inducing cleavage of PARP.

In these experiments, 0.6×10^6 normal human B cells from healthy donors (percent purity between 85-95%) were stimulated with 1 μg/ml sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). CHIR-12.12 (10 μg/ml) and control IgG were then added. Cells were collected at 0, 20 minutes, 2 hours, 6 hours, 18 hours, and 26 hours. Cleaved caspase-9, cleaved caspase-3, cleaved PARP, and β-actin controls were detected in cell lysates by Western blot.

Briefly, it was observed that CD40L-mediated CD40 stimulation provided survival signals as it did not result in increases of cleaved caspase-9, cleaved caspase-3, or cleaved PARP over time, indicating that the cells were not undergoing apoptosis. However, treatment with CHIR-12.12 resulted in an increase of these cleavage products, indicating that CHIR-12.12 treatment abrogated the effects of CD40L binding on survival

signaling in sCD40L-stimulated normal B cells, restoring B cell apoptosis (data not shown).

CHIR-12.12 inhibited expression of "survival" anti-apoptotic proteins.

In these experiments, 0.6 x 10^6 normal human B cells from healthy donors (percent purity between 85-95%) were stimulated with 1 μg/ml sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). CHIR-12.12 (10 μg/ml) and control IgG were then added. Cells were collected at 0, 20 minutes, 2 hours, 6 hours, 18 hours, and 26 hours. Mcl-1, XIAP, CD40, and β-actin controls were detected in cell lysates by Western blot.

Briefly, sCD40L stimulation resulted in sustained expression of Mcl-1 and XIAP over time. However, treatment of the sCD40L-stimulated cells with CHIR 12.12 resulted in a decrease in expression of these proteins overtime (data not shown). Since Mcl-1 and XIAP are "survival" signals capable of blocking the apoptotic pathway, these results demonstrate that CHIR-12.12 treatment removes the blockade against apoptosis in sCD40L-stimulated normal B cells.

CHIR-12.12 treatment inhibited phosphorylation of IKKα (Ser180) and IKK β (Ser 181) in normal B cells.

In these experiments, 1.0 x 10^6 normal human B cells from healthy donors (percent purity between 85-95%) were stimulated with 1 μg/ml sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). CHIR-12.12 (10 μg/ml) and control IgG were then added. Cells were collected at 0 and 20 minutes. Phosphorylated IKKα (Ser180) and IKK β (Ser 181) and total IKKβ controls were detected in cell lysates by Western blot.

Briefly, stimulation by sCD40L resulted in phosphorylation of IKKα (Ser180) and IKK β (Ser 181) over time; however, treatment with CHIR-12.12 abrogated this response to sCD40L stimulation in normal B cells (data not shown).

CHIR-12.12 treatment inhibited survival mediated by CD40 ligand in a dose-dependent manner.

In these experiments, 0.6 x 10^6 normal human B cells from healthy donors percent purity between 85-95%) were stimulated with 1 μg/ml sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). CHIR-12.12 (0.01, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 μg/ml) and control IgG were then added. Cells were collected at 24 hours. Cleaved PARP, and β-actin controls were detected in cell lysates by Western blot.

Briefly, CHIR-12.12 treatment resulted in increase of PARP cleavage in sCD40L stimulated cells in a dose-dependent manner and therefore abrogated the survival signaling pathway in sCD40L-stimulated normal B cells (data not shown).

CHIR-12.12 inhibited expression of "survival" anti-apoptotic proteins in a dose-dependent manner.

In these experiments, 0.6 x 10^6 normal human B cells from healthy donors (percent purity between 85-95%) were stimulated with 1 μg/ml sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). CHIR-12.12 (0.5, 2, and 10 μg/ml) and control IgG were then added. Cells were collected at 22 hours. Mcl-1, XIAP, cleaved PARP, and β-actin controls were detected in cell lysates by Western blot.

Briefly, CHIR-12.12 treatment reduced Mcl-1 and XIAP expression and increased cleaved PARP expression in sCD40L-stimulated cells in a dose-dependent manner, and thus abrogated these blockades to the apoptotic pathway in sCD40L-stimulated normal B cells (data not shown).

CHIR-12.12 did not affect expression of anti-apoptotic proteins, cleaved-PARP, and XIAP, in the absence of soluble CD40L signaling.

In these experiments, 1.0 x 10^6 normal human B cells from healthy donors (percent purity between 85-95%) were treated with CHIR-12.12 (10 μg/ml) and control IgG only (i.e., cells were not pre-stimulated with sCD40L before adding antibody). Cells

were collected at 0, 4, 14, and 16 hours. XIAP, cleaved PARP, and β-actin controls were detected in cell lysates by Western blot.

Briefly, the results show that without sCD40L stimulation, the cells expressed increased concentrations of cleaved PARP, while expression of XIAP remained constant, in both IgG treated control cells and CHIR-12.12 cells (data not shown). These data indicate that CHIR-12.12 does not trigger apoptosis in normal human B cells without CD40L stimulation.

CHIR-12.12 inhibits phosphorylation of IKKα (Ser180) and IKKβ (Ser181), Akt, ERK, and p38 in normal B cells.

In these experiments, 1.0 x 10^6 normal human B cells from healthy donors (percent purity between 85-95%) were serum starved in 1% FBS-containing media and stimulated with 1 μg/ml sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). The cultures were treated with CHIR-12.12 (1 and 10 μg/ml) and control IgG. Cells were collected at 0 and 20 minutes. Phospho-IKKα, phospho-IKKβ, total IKKβ, phospho-ERK, total ERK, phospho-Akt, total Akt, phospho-p38, and total p38 were detected in cell lysates by Western blot.

Briefly, sCD40L stimulation resulted in increases in IKKα/β phosphorylation, ERK phosphorylation, Akt phosphorylation, and p38 phosphorylation, thus leading to survival and or proliferation of the cells. Treatment of the cells with CHIR-12.12 abrogated the effects of sCD40L stimulation on these signaling pathways in normal B cells (data not shown).

CHIR 12.12 inhibits multiple signaling pathways such as PI3K and MEK /ERK in the CD40 signaling cascade.

In these experiments, 1.0 x 10^6 normal human B cells from healthy donors (percent purity between 85-95%) were serum starved in 1% FBS-containing media and stimulated with 1 μg/ml sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). The cultures were also treated with CHIR-12.12 (1 and 10 μg/ml), Wortmanin, (a PI3K/Akt

inhibitor; 1 and 10 μM), LY 294002 (a PI3K/Akt inhibitor; 10 and 30 μM), and PD 98095 (a MEK inhibitor; 10 and 30 μg/ml). Cells were collected at 0 and 20 minutes. Phospho-ERK, phospho-Akt, total Akt, phospho-IKKα/β, and total were detected in cell lysates by Western blot.

Briefly, the results show that CHIR-12.12 abrogated the phosphorylation of all of these signal transduction molecules, whereas the signal transduction inhibitors showed only specific abrogation of signaling, indicating that CHIR-12.12 likely inhibits upstream of these signal transduction molecules mediated by CD40L stimulation (data not shown).

CHIR-12.12 inhibits the binding of signaling molecules TRAF2 and TRAF3 to the cytoplasmic domain of CD40 in normal B cells.

In these experiments, 4.0×10^6 normal human B cells from healthy donors (percent purity between 85-95%) were serum starved for four hours in 1% FBS-containing media and stimulated with 1 μg/ml sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK) for 20 minutes. Cells were collected at 0 and 20 minutes. CD40 was immunoprecipitated using polyclonal anti-CD40 (Santa Cruz Biotechnology, CA), and was probed in a Western blot with anti-TRAF2 mAb (Santa Cruz Biotechnology, CA), anti-TRAF3 mAb (Santa Cruz Biotechnology, CA), and anti-CD40 mAb (Santa Cruz Biotechnology, CA).

Briefly, the results show that TRAF2 and TRAF3 co-precipitated with CD40 after sCD40L stimulation. In contrast, treatment with CHIR-12.12 abrogated formation of the CD40-TRAF2/3 signaling complex in sCD40L-stimulated normal B cells. There were no changes in CD40 expression (data not shown).

Without being bound by theory, the results of these experiments, and the results in the examples outlined above, indicate that the CHIR-12.12 antibody is a dual action antagonist anti-CD40 monoclonal antibody having a unique combination of attributes. This fully human monoclonal antibody blocks CD40L-mediated CD40 signaling pathways for survival and proliferation of B cells; this antagonism leads to ultimate cell death. CHIR-12.12 also mediates recognition and binding by effector cells, initiating antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC). Once CHIR-12.12 is bound to effector cells, cytolytic enzymes are released, leading to B-cell apoptosis and lysis. CHIR-12.12

is a more potent anti-tumor antibody than is rituximab when compared in pre-clinical tumor models.

Example 21: Agonist and Antagonist Activity Against Primary Cancer Cell from NHL, CLL, and NM Patients

In collaboration with clinical investigators, the candidate mAbs is tested for a variety of activities (listed below) against primary cancer cells from NHL and CLL and multiple myeloma patients.

- Agonist effect in proliferation assays (8 NHL patients, 8 CLL patients and 8 MM patients)
- Antagonist effect in proliferation assays (8 NHL patients, 8 CLL patients and 8 MM patients)
- Apoptotic effect by Annexin V assay (3-4 NHL patients, 4 CLL patients, and 4 MM patients)
- Reversing survival signal by Annexin V assay (3 NHL patients, 3 CLL patients and 3 MM patients)
- Complement dependent cytotoxicity (4 NHL patients, 4 CLL patients, and 4MM patients)
- Antibody dependent cytotoxicity (6 NHL patients, 6 CLL patients and 6 MM patients)

Example 22: Identification of Relevant Animal Species for Toxicity Studies

As these two candidate antibodies do not cross-react with rodent CD40, other species must be identified for testing toxicologic effects.

The ability of the two candidate anti-CD40 antibodies to cross-react with animal CD40 is tested by flow cytometric assays. Rat, rabbit, dog, cynomolgus monkeys and marmoset monkeys are tested for this study.

The candidate antibodies show antagonist activity upon binding to CD40 on human B cells. To identify an animal species that has similar response to candidate antibodies, lymphocytes from species that show binding to candidate antibodies are tested in proliferation assays for antagonist activity. The lymphocytes from the species selected

for antagonistic binding of candidate antibodies are further tested for their ability to serve as effector cells for killing CD40-expressing lymphoma cell lines through the mechanism of ADCC. Finally the selected animal species are tested in an IHC study for the tissue-binding pattern of candidate antibodies. The animal species responding to the candidate antibodies in these assays in a manner similar to that observed for human cells are chosen for toxicology studies.

Initial studies indicate that the candidate anti-CD40 mAbs cross-react with cynomolgus monkey CD40.

Example 23: Tumor Targeting Profile of CHIR-5.9 and CHIR-12.12

To determine the relative tumor targeting profile of CHIR-12.12 and CHIR-5.9 mAbs, fluorescent-labeled candidate mAbs and isotype control antibodies are administered into tumor-bearing mice. Tumor specimens and normal organs are harvested at different time points after dosing. The accumulation of labeled antibody in tumors and normal organs is analyzed.

Example 24: Mechanism of Action of CHIR-5.9 and CHIR-12.12

To elucidate the mechanism(s) that mediates the tumor growth inhibition by the CHIR-5.9 and CHIR-12.12 mAbs, the following studies are undertaken:

Fc-receptor knock-out or blockage model: ADCC is mediated by binding of effecter cells such as NK, marcrophage, and monocytes to the Fc portion of antibody through Fc receptor. Mice deficient in activating Fc receptors as well as antibodies engineered to disrupt Fc binding to those receptors will block the ADCC mediated tumor growth inhibition. Loss or significantly reduced tumor inhibition in this model will suggest that the tumor growth inhibition by these two candidate mAbs is mainly mediated by ADCC mechanism.

Example 25: Liquid Pharmaceutical Formulation for Antagonist Anti-CD40 Antibodies

The objective of this study was to investigate the effects of solution pH on stability of the antagonist anti-CD40 antibody CHIR-12.12 by both biophysical and biochemical methods in order to select the optimum solution environment for this

antibody. Differential Scanning Calorimetry (DSC) results showed that the conformation stability of CHIR-12.12 is optimal in formulations having pH 5.5-6.5. Based on a combination of SDS-PAGE, Size-Exclusion HPLC (SEC-HPLC), and Cation-Exchange HPLC (CEX-HPLC) analysis, the physicochemical stability of CHIR-12.12 is optimal at about pH 5.0-5.5. In view of these results, one recommended liquid pharmaceutical formulation comprising this antibody is a formulation comprising CHIR-12.12 at about 20 mg/ml formulated in about 10 mM sodium succinate, about 150 mM sodium chloride, and having a pH of about pH 5.5.

Materials and Methods

The CHIR-12.12 antibody used in the formulation studies is a human monoclonal antibody produced by a CHO cell culture process. This MAb has a molecular weight of 150 kDa and consists of two light chains and two heavy chains linked together by disulfide bands. It is targeted against the CD40 cell surface receptor on CD40-expressing cells, including normal and malignant B cells, for treatment of various cancers and autoimmune/inflammatory diseases.

The anti-CD40 drug substance used for this study was a CHO-derived purified anti-CD40 (CHIR-12.12) bulk lot. The composition of the drug substance was 9.7 mg/ml CHIR-12.12 antibody in 10 mM sodium citrate, 150 mM sodium chloride, at pH 6.5. The control sample in the study was the received drug substance, followed by freezing at ≤ -60°C, thawing at RT and testing along with stability samples at predetermined time points. The stability samples were prepared by dialysis of the drug substance against different pH solutions and the CHIR-12.12 concentration in each sample was determined by UV 280 as presented in Table 20.

Table 20. CHIR-12.12 formulations.

Buffer Composition	pH	CHIR-12.12 Concentration (mg/ml)
10 mM sodium citrate, 150 mM sodium chloride	4.5	9.0
10 mM sodium succinate, 150 mM sodium chloride	5.0	9.3
10 mM sodium succinate, 150 mM sodium chloride	5.5	9.2
10 mM sodium citrate, 150 mM sodium chloride	6.0	9.7
10 mM sodium citrate, 150 mM sodium chloride	6.5	9.4

10 mM sodium phosphate, 150 mM sodium chloride	7.0	9.4
10 mM sodium phosphate, 150 mM sodium chloride	7.5	9.5
10 mM glycine, 150 mM sodium chloride	9.0	9.5

Physicochemical stability of the CHIR-12.12 antibody in the various formulations was assayed using the following protocols.

Differential Scanning Calorimetry (DSC

Conformational stability of different formulation samples was monitored using a MicroCal VP-DSC upon heating 15°C to 90°C at 1°C/min.

SDS-PAGE

Fragmentation and aggregation were estimated using 4-20% Tris-Glycine Gel under non-reducing and reducing conditions. Protein was detected by Coomassie blue staining.

Size Exclusion Chromatograph (SEC-HPLC)

Protein fragmentation and aggregation were also measured by a Water Alliance HPLC with a Tosohaas TSK-GEL 3000SWXL column, 100 mM sodium phosphate, pH 7.0 as mobile phase at a flow rate of 0.7 ml/min.

Cation Exchange Chromatography (CEX-HPLC)

Charge change related degradation was measured using Waters 600s HPLC system with a Dionex Propac WCX-10 column, 50 mM HEPEs, pH 7.3 as mobile phase A and 50 mM HEPES containing 500 mM NaCl, pH 7.3 as mobile phase B at a flow rate of 0.5°C/min.

Results and Discussion

Conformational stability study.

Thermal unfolding of CHIR-12.12 revealed at least two thermal transitions, probably representing unfolding melting of the Fab and the Fc domains, respectively. At higher temperatures, the protein presumably aggregated, resulting in loss of DSC signal.

For the formulation screening purpose, the lowest thermal transition temperature was defined as the melting temperature, Tm, in this study. Figure 13 shows the thermal melting temperature as a function of formulation pHs. Formulations at pH 5.5-6.5 provided anti-CD40 with higher conformational stability as demonstrated by the higher thermal melting temperatures.

SDS-PAGE analysis.

The CHIR-12.12 formulation samples at pH 4.5-9.0 were incubated at 40°C for 2 months and subjected to SDS-PAGE analysis (data not shown). Under non-reducing conditions, species with molecular weight (MW) of 23 kDa and 27 kDa were observed in formulations above pH 5.5, and species with MW of 51 kDa were observed in all formulations, but appeared less at pH 5.0-5.5. A species with MW of 100 kDa could be seen at pH 7.5 and pH 9.0.

Under reducing conditions, CHIR-12.12 was reduced into free heavy chains and light chains with MW of 50 kDa and 24 kDa, respectively. The 100 kDa species seemed not fully reducible and increased with increasing solution pH, suggesting non-disulfide covalent association might occur in the molecules. Since there were other species with unknown identities on SDS-PAGE, stability comparison of each formulation is based on the remaining purity of CHIR-12.12. Formulations at pH 5.0-6.0 provided a more stable environment to CHIR-12.12. Few aggregates were detected by SDS-PAGE (data not shown).

SEC-HPLC analysis .

SEC-HPLC analysis detected the intact CHIR-12.12 as the main peak species, an aggregation species as a front peak species separate from the main peak species, a large fragment species as a shoulder peak on the back of the main peak species, and small fragment species were detected post-main peak species. After incubation at 5°C and 25°C for 3 months, negligible amounts of protein fragments and aggregates (<1.0%) were detected in the above formulations and the CHIR-12.12 main peak species remained

greater than 99% purity (data not shown). However, protein fragments gradually developed upon storage at 40°C and more fragments formed at pH 4.5 and pH 6.5-9.0, as shown in Table 21. After incubating the CHIR-12.12 formulations at 40°C for 3 months, about 2-3% aggregates were detected in pH 7.5 and pH 9.0, while less than 1% aggregates were detected in other pH formulations (data not shown). The SEC-HPLC results indicate CHIR-12.12 is more stable at about pH 5.0-6.0.

Table 21. SEC-HPLC results of CHIR-12.12 stability samples under real-time and accelerated storage conditions.

Sample	Main peak %				Fragments %			
	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

CEX-HPLC analysis.

CEX-HPLC analysis detected the intact CHIR-12.12 as the main peak species, acidic variants eluted earlier than the main peak species, and C-terminal lysine addition variants eluted post-main peak species. Table 22 shows the dependence of the percentages of the remaining main peak CHIR-12.12 species and acidic variants on solution pH. The control sample already contained a high degree of acidic species (~33%), probably due to early-stage fermentation and purification processes. The susceptibility of CHIR-12.12 to higher pH solutions is evidenced by two facts. First, the initial formulation sample at pH 9.0 (t=0) already generated 12% more acidic species than the control. Second, the percentage of acidic species increased sharply with increasing pH. The charge change-related degradation is likely due to deamidation. The

above data indicate that this type of degradation of CHIR-12.12 was minimized at about pH 5.0-5.5.

Table 22. Percentage of peak area by CEX-HPLC for CHIR-12.12 in different pH formulations under real-time and accelerated storage conditions.

Sample	Main peak %					Acidic variants %				
	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	-	-	-

Conclusion

The pH has a significant effect on conformational and physicochemical stabilities of CHIR-12.12. Charge change-related degradation was determined to be the main degradation pathway for CHIR-12.12, which was minimized at pH 5.0-5.5. Based on overall stability data, one recommended liquid pharmaceutical formulation comprising this antibody is a formulation comprising CHIR-12.12 at about 20 mg/ml formulated in about 10 mM sodium succinate, about 150 mM sodium chloride, and having a pH of about pH 5.5.

Example 26: Clinical Studies with CHIR-5.9 and CHIR-12.12

Clinical Objectives

The overall objective is to provide an effective therapy for B cell tumors by targeting them with an anti-CD40 IgG1. These tumors include B-cell lymphoma, Chronic Lymphocytic Lyphoma (CLL), Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL), Multiple Myeloma (MM), Waldenstrom's Macroglobulinemia, and Systemic Castleman's Disease.

The signal for these diseases is determined in phase II although some measure of activity may be obtained in phase I. Initially the agent is studied as a single agent, but will be combined with other agents, chemotherapeutics, and other antibodies, as development proceeds.

Phase I

- Evaluate safety and pharmacokinetics – dose escalation in subjects with B cell malignancies.
- Choose dose based on safety, tolerability, and change in serum markers of CD40. In general an MTD is sought but other indications of efficacy (depletion of CD40+ B cells, etc.) may be adequate for dose finding.
- Consideration of more than one dose especially for different indications, e.g., the CLL dose may be different than the NHL. Thus, some dose finding may be necessary in phase II.
- Patients are dosed weekly with real-time pharmacokinetic (Pk) sampling. Initially a 4-week cycle is the maximum dosing allowed. The Pk may be highly variable depending on the disease studied, density of CD40 etc.
- This trial(s) is open to subjects with B-cell lymphoma, CLL, and potentially other B cell malignancies.
- Decision to discontinue or continue studies is based on safety, dose, and preliminary evidence of anti-tumor activity.
- Activity of drug as determined by response rate is determined in Phase II.
- Identify dose(s) for Phase II.

Phase II

Several trials will be initiated in the above-mentioned tumor types with concentration on B-cell lymphoma, CLL, and Multiple Myeloma (MM). Separate trials may be required in low grade and intermediate/high grade NHL as CD40 may have a different function depending on the grade of lymphoma. In low-grade disease, CD40 acts more as a survival factor, preventing apoptosis. In higher-grade disease, interruption of

CD40 signaling may lead to cell death. More than one dose, and more than one schedule may be tested in a randomized phase II setting.

In each disease, target a population that has failed current standard of care:

- CLL: patients who were resistant to Campath® and chemotherapy.
- Low grade NHL: Rituxan® or CHOP-R failures
- Intermediate NHL: CHOP-R failures
- Multiple Myeloma: Chemotherapy failures

- ✓ Decision to discontinue or continue with study is based on proof of therapeutic concept in Phase II
- ✓ Determine whether surrogate marker can be used as early indication of clinical efficacy
- ✓ Identify doses for Phase III

Phase III

Phase III will depend on where the signal is detected in phase II, and what competing therapies are considered to be the standard. If the signal is in a stage of disease where there is no standard of therapy, then a single arm, well-controlled study could serve as a pivotal trial. If there are competing agents that are considered standard, then head-to-head studies are conducted.

Many modifications and other embodiments of the inventions set forth herein will come to mind to one skilled in the art to which these inventions pertain having the benefit of the teachings presented in the foregoing descriptions and the associated drawings. Therefore, it is to be understood that the inventions are not to be limited to the specific embodiments disclosed and that modifications and other embodiments are intended to be included within the scope of the appended claims and list of embodiments disclosed

herein. Although specific terms are employed herein, they are used in a generic and descriptive sense only and not for purposes of limitation.

All publications and patent applications mentioned in the specification are indicative of the level of those skilled in the art to which this invention pertains. All publications and patent applications are herein incorporated by reference to the same extent as if each individual publication or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

Applicant's or agent's file reference	PP20107.004	International application No.	PCT/US2004/

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13*bis*)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 18, line 25

B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT — Further deposits are identified on an additional sheet ☒

Name of depositary institution: American Type Culture Collection

Address of depositary institution *(including postal code and country)*: 10801 University Blvd. Manassas, VA 20110-2209 USA

Date of deposit	Accession Number
17 September 2003	PTA-5542

C. ADDITIONAL INDICATIONS *(leave blank if not applicable)* — This information is continued on an additional sheet ☐

Page 22, line 20; page 75, line 11; page 142 line 9

D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE *(if the indicators are not for all designated States)*

E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS *(leave blank if not applicable)*

The indications listed below will be submitted to the International Bureau later *(specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")*

For receiving Office use only	For International Bureau use only
☐ This sheet was received with the international application	☐ This sheet was received with the International Bureau on:
Authorized officer	Authorized officer

Applicant's or agent's file reference	PP20107.004	International application No.	PCT/US2004/

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13*bis*)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 18, line 25

B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT — Further deposits are identified on an additional sheet ☐

Name of depositary institution

American Type Culture Collection

Address of depositary institution *(including postal code and country)*

10801 University Blvd.
Manassas, VA 20110-2209 USA

Date of deposit	Accession Number
17 September 2003	PTA-5543

C. ADDITIONAL INDICATIONS *(leave blank if not applicable)* — This information is continued on an additional sheet ☐

Page 22, line 20; page 75, line 11; page 127, line 15; page 142, line 10

D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE *(if the indications are not for all designated States)*

E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS *(leave blank if not applicable)*

The indications listed below will be submitted to the International Bureau later *(specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")*

For receiving Office use only	For International Bureau use only
☐ This sheet was received with the international application	☐ This sheet was received with the International Bureau on:
Authorized officer	Authorized officer

32

ATCC

10801 University Blvd • Manassas, VA 20110-2209 • Telephone 703-365-2700 • FAX: 703-365-2745

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3 AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.

To: (Name and Address of Depositor or Attorney)

Cilron Corporation
Attn: Karen Van Ness
4560 Horton Street
Emeryville, CA 94608

Depositor on Behalf of: Cilron Corporation

Identification References by Depositor:	Patent Deposit Designation
Mouse Hybridoma 131.2F8.5.9: CMCC#12047	PTA-5542
Mouse Hybridoma 153.3E2D10D6.12.12: CMCC#12056	PTA-5543

The deposits were accompanied by: ___ a scientific description, a proposed taxonomic description indicated above. The deposits were received September 17, 2003 by this International Depository Authority and have been accepted.

AT YOUR REQUEST: X We will inform you of requests for the strains for 30 years.

The strains will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the strains, and ATCC is instructed by the United States Patent & Trademark Office or the depositor to release said strains.

If the cultures should die or be destroyed during the effective term of the deposit, it shall be your responsibility to replace them with living cultures of the same.

The strains will be maintained for a period of at least 30 years from date of deposit, or five years after the most recent request for a sample, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

The viability of the cultures cited above was tested September 23, 2003. On that date, the cultures were viable.

International Depository Authority: American Type Culture Collection, Manassas, VA 20110-2209 USA.

Signature of person having authority to represent ATCC:

Marie Harris

Marie Harris, Patent Specialist, ATCC Patent Depository

Date: October 3, 2003

cc: Lisa Alexander
Ref: Docket or Case No.: P20107.001

THAT WHICH IS CLAIMED:

1. A human monoclonal antibody that is capable of specifically binding to a human CD40 antigen expressed on the surface of a human CD40-expressing cell, said monoclonal antibody being free of significant agonist activity, wherein said monoclonal antibody exhibits increased anti-tumor activity relative to an equivalent amount of the monoclonal chimeric anti-CD20 monoclonal antibody IDEC-C2B8, wherein said anti-tumor activity is assayed in a staged nude mouse xenograft tumor model using the Daudi human B cell lymphoma cell line.

2. The human monoclonal antibody of claim 1, wherein said antibody is selected from the group consisting of:

a) the monoclonal antibody CHIR-12.12;

b) the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 12.12, deposited with the ATCC as Patent Deposit No. PTA-5543;

c) a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:2, the sequence shown in SEQ ID NO:4, the sequence shown in SEQ ID NO:5, both the sequence shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4, and both the sequence shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:5;

d) a monoclonal antibody having an amino acid sequence encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:1, the sequence shown in SEQ ID NO:3, and both the sequence shown in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:3;

e) a monoclonal antibody that binds to an epitope capable of binding the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 12.12;

f) a monoclonal antibody that binds to an epitope comprising residues 82-87 of the human CD40 sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12;

g) a monoclonal antibody that competes with the monoclonal antibody CHIR-12.12 in a competitive binding assay;

h) the monoclonal antibody of preceding item a) or a monoclonal antibody of any one of preceding items c)-g), wherein said antibody is recombinantly produced; and

i) a monoclonal antibody that is an antigen-binding fragment of a monoclonal antibody of any one of preceding items a)-h), wherein said fragment retains the capability of specifically binding to said human CD40 antigen.

3. The monoclonal antibody of claim 1, wherein said monoclonal antibody binds to said human CD40 antigen with an affinity (K_D) of at least about 10^{-6} M to about 10^{-12} M.

4. A hybridoma cell line capable of producing the monoclonal antibody of claim 1.

5. A method for treating a cancer characterized by expression of CD40, comprising administering to a human patient an effective amount of a human anti-CD40 monoclonal antibody of claim 1.

6. The method of claim 5, wherein said cancer is selected from the group consisting of a non-Hodgkins lymphoma, chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma, B cell lymphoma, high-grade B cell lymphoma, intermediate-grade B cell lymphoma, low-grade B cell lymphoma, B cell acute lympohoblastic leukemia, myeloblastic leukemia, and Hodgkin's disease.

7. A human monoclonal antibody that is capable of specifically binding to a human CD40 antigen expressed on the surface of a human CD40-expressing cell, said monoclonal antibody being free of significant agonist activity, whereby, when said monoclonal antibody binds to the CD40 antigen expressed on the surface of said cell, the growth or differentiation of said cell is inhibited, wherein said antibody is selected from the group consisting of:

a) the monoclonal antibody CHIR-5.9 or CHIR-12.12;

b) the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 5.9 or 12.12;

c) a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:6, the sequence shown in SEQ ID NO:7, the sequence shown in SEQ ID NO:8, both the sequence shown in SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:7, and both the sequence shown in SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:8;

d) a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:2, the sequence shown in SEQ ID NO:4, the sequence shown in SEQ ID NO:5, both the sequence shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4, and both the sequence shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:5;

e) a monoclonal antibody having an amino acid sequence encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:1, the sequence shown in SEQ ID NO:3, and both the sequence shown in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:3;

f) a monoclonal antibody that binds to an epitope capable of binding the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 5.9 or 12.12;

g) a monoclonal antibody that binds to an epitope comprising residues 82-87 of the human CD40 sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12;

h) a monoclonal antibody that binds to an epitope comprising residues 82-89 of the human CD40 sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12;

i) a monoclonal antibody that competes with the monoclonal antibody CHIR-5.9 or CHIR-12.12 in a competitive binding assay;

j) the monoclonal antibody of preceding item a) or a monoclonal antibody of any one of preceding items c)-i), wherein said antibody is recombinantly produced; and

k) a monoclonal antibody that is an antigen-binding fragment of a monoclonal antibody of any one of preceding items a)-j), wherein said fragment retains the capability of specifically binding to said human CD40 antigen.

8. The antigen-binding fragment of claim 7, wherein said fragment is selected from the group consisting of a Fab fragment, an $F(ab')_2$ fragment, an Fv fragment, and a single-chain Fv fragment.

9. The monoclonal antibody of claim 7, wherein said monoclonal antibody binds to said human CD40 antigen with an affinity (K_D) of at least about 10^{-6} M to about 10^{-12} M.

10. An isolated nucleic acid molecule comprising a polynucleotide that encodes an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, and SEQ ID NO:8.

11. A hybridoma cell line capable of producing a human monoclonal antibody having specificity for a human CD40 antigen expressed on the surface of a human CD40-expressing cell, whereby said monoclonal antibody is free of significant agonist activity, whereby, when said monoclonal antibody binds to the CD40 antigen expressed on the surface of said cell, the growth or differentiation of said cell is inhibited, and wherein said monoclonal antibody is selected from the group consisting of:

a) the monoclonal antibody CHIR-5.9 or CHIR-12.12;

b) the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 5.9 or 12.12;

c) a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:6, the sequence shown in SEQ ID NO:7, the sequence shown in SEQ ID NO:8, both the sequence shown in SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:7, and both the sequence shown in SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:8;

d) a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:2, the sequence shown in SEQ ID NO:4, the sequence shown in SEQ ID NO:5, both the sequence shown in SEQ

ID NO:2 and SEQ ID NO:4, and both the sequence shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:5;

e) a monoclonal antibody having an amino acid sequence encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:1, the sequence shown in SEQ ID NO:3, and both the sequence shown in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:3;

f) a monoclonal antibody that binds to an epitope capable of binding the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 5.9 or 12.12;

g) a monoclonal antibody that binds to an epitope comprising residues 82-87 of the human CD40 sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12;

h) a monoclonal antibody that binds to an epitope comprising residues 82-89 of the human CD40 sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12;

i) a monoclonal antibody that competes with the monoclonal antibody CHIR-5.9 or CHIR-12.12 in a competitive binding assay; and,

j) a monoclonal antibody that is an antigen-binding fragment of a monoclonal antibody of a)-i), wherein said fragment retains the capability of specifically binding to said human CD40 antigen.

12. A method for inhibiting growth or differentiation of a normal human B cell, comprising contacting said B cell with an effective amount of a human anti-CD40 monoclonal antibody selected from the group consisting of:

a) the monoclonal antibody CHIR-5.9 or CHIR-12.12;

b) the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 5.9 or 12.12;

c) a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:6, the sequence shown in SEQ ID NO:7, the sequence shown in SEQ ID NO:8, both the sequence shown in SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:7, and both the sequence shown in SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:8;

d) a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:2, the sequence shown in

SEQ ID NO:4, the sequence shown in SEQ ID NO:5, both the sequence shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4, and both the sequence shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:5;

e) a monoclonal antibody having an amino acid sequence encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:1, the sequence shown in SEQ ID NO:3, and both the sequence shown in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:3;

f) a monoclonal antibody that binds to an epitope capable of binding the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 5.9 or 12.12;

g) a monoclonal antibody that binds to an epitope comprising residues 82-87 of the human CD40 sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12;

h) a monoclonal antibody that binds to an epitope comprising residues 82-89 of the human CD40 sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12;

i) a monoclonal antibody that competes with the monoclonal antibody CHIR-5.9 or CHIR-12.12 in a competitive binding assay;

j) the monoclonal antibody of preceding item a) or a monoclonal antibody of any one of preceding items c)-i), wherein said antibody is recombinantly produced; and

k) a monoclonal antibody that is an antigen-binding fragment of a monoclonal antibody of any one of preceding items a)-j), wherein said fragment retains the capability of specifically binding to said human CD40 antigen;

said antibody or fragment thereof being free of significant agonist activity, and whereby when said antibody or fragment thereof binds to said CD40 antigen on said B cell, the growth or differentiation of said B cell is inhibited.

13. The method of claim 12, wherein said monoclonal antibody or fragment thereof binds to said human CD40 antigen with an affinity (K_D) of at least about 10^{-6} M to about 10^{-12} M.

14. The method of claim 12, wherein said fragment is selected from the group consisting of a Fab fragment, an $F(ab')_2$ fragment, an Fv fragment, and a single-chain Fv fragment.

15. A method for inhibiting proliferation of a normal human B cell, wherein said proliferation is augmented by the interaction of a CD40 ligand with a CD40 antigen expressed on the surface of said B cell, said method comprising contacting said B cell with an effective amount of a human anti-CD40 monoclonal antibody selected from the group consisting of:

a) the monoclonal antibody CHIR-5.9 or CHIR-12.12;

b) the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 5.9 or 12.12;

c) a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:6, the sequence shown in SEQ ID NO:7, the sequence shown in SEQ ID NO:8, both the sequence shown in SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:7, and both the sequence shown in SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:8;

d) a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:2, the sequence shown in SEQ ID NO:4, the sequence shown in SEQ ID NO:5, both the sequence shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4, and both the sequence shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:5;

e) a monoclonal antibody having an amino acid sequence encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:1, the sequence shown in SEQ ID NO:3, and both the sequence shown in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:3;

f) a monoclonal antibody that binds to an epitope capable of binding the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 5.9 or 12.12;

g) a monoclonal antibody that binds to an epitope comprising residues 82-87 of the human CD40 sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12;

h) a monoclonal antibody that binds to an epitope comprising residues 82-89 of the human CD40 sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12;

i) a monoclonal antibody that competes with the monoclonal antibody CHIR-5.9 or CHIR-12.12 in a competitive binding assay;

j) the monoclonal antibody of preceding item a) or a monoclonal antibody of any one of preceding items c)-i), wherein said antibody is recombinantly produced; and

k) a monoclonal antibody that is an antigen-binding fragment of a monoclonal antibody of any one of preceding items a)-j), wherein said fragment retains the capability of specifically binding to said human CD40 antigen;

said antibody or fragment thereof being free of significant agonist activity, and whereby when said antibody or fragment thereof binds to said CD40 antigen on said B cell, the growth or differentiation of said B cell is inhibited.

16. The method of claim 15, wherein said monoclonal antibody binds to said human CD40 antigen with an affinity (K_D) of at least about 10^{-6} M to about 10^{-12} M.

17. The method of claim 15, wherein said fragment is selected from the group consisting of a Fab fragment, an $F(ab')_2$ fragment, an Fv fragment, and a single-chain Fv fragment.

18. A method for inhibiting antibody production by B cells in a human patient, comprising administering to a human patient an effective amount of a human anti-CD40 monoclonal antibody or fragment thereof selected from the group consisting of:

a) the monoclonal antibody CHIR-5.9 or CHIR-12.12;

b) the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 5.9 or 12.12;

c) a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:6, the sequence shown in SEQ ID NO:7, the sequence shown in SEQ ID NO:8, both the sequence shown in SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:7, and both the sequence shown in SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:8;

d) a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:2, the sequence shown in SEQ ID NO:4, the sequence shown in SEQ ID NO:5, both the sequence shown in SEQ

ID NO:2 and SEQ ID NO:4, and both the sequence shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:5;

e) a monoclonal antibody having an amino acid sequence encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:1, the sequence shown in SEQ ID NO:3, and both the sequence shown in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:3;

f) a monoclonal antibody that binds to an epitope capable of binding the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 5.9 or 12.12;

g) a monoclonal antibody that binds to an epitope comprising residues 82-87 of the human CD40 sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12;

h) a monoclonal antibody that binds to an epitope comprising residues 82-89 of the human CD40 sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12;

i) a monoclonal antibody that competes with the monoclonal antibody CHIR-5.9 or CHIR-12.12 in a competitive binding assay;

j) the monoclonal antibody of preceding item a) or a monoclonal antibody of any one of preceding items c)-i), wherein said antibody is recombinantly produced; and

k) a monoclonal antibody that is an antigen-binding fragment of a monoclonal antibody of any one of preceding items a)-j), wherein said fragment retains the capability of specifically binding to said human CD40 antigen;

said antibody or fragment thereof being free of significant agonist activity, and whereby when said antibody or fragment thereof binds to said CD40 antigen on said B cell, the growth or differentiation of said B cell is inhibited.

19. The method of claim 18, wherein said monoclonal antibody binds to said human CD40 antigen with an affinity (K_D) of at least about 10^{-6} M to about 10^{-12} M.

20. The method of claim 18, wherein said fragment is selected from the group consisting of a Fab fragment, an $F(ab')_2$ fragment, an Fv fragment, and a single-chain Fv fragment.

21. A method for inhibiting growth of cancer cells of B cell lineage, comprising contacting said cancer cells with an effective amount of a human anti-CD40 monoclonal antibody selected from the group consisting of:

a) the monoclonal antibody CHIR-5.9 or CHIR-12.12;

b) the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 5.9 or 12.12;

c) a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:6, the sequence shown in SEQ ID NO:7, the sequence shown in SEQ ID NO:8, both the sequence shown in SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:7, and both the sequence shown in SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:8;

d) a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:2, the sequence shown in SEQ ID NO:4, the sequence shown in SEQ ID NO:5, both the sequence shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4, and both the sequence shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:5;

e) a monoclonal antibody having an amino acid sequence encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:1, the sequence shown in SEQ ID NO:3, and both the sequence shown in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:3;

f) a monoclonal antibody that binds to an epitope capable of binding the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 5.9 or 12.12;

g) a monoclonal antibody that binds to an epitope comprising residues 82-87 of the human CD40 sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12;

h) a monoclonal antibody that binds to an epitope comprising residues 82-89 of the human CD40 sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12;

i) a monoclonal antibody that competes with the monoclonal antibody CHIR-5.9 or CHIR-12.12 in a competitive binding assay;

j) the monoclonal antibody of preceding item a) or a monoclonal antibody of any one of preceding items c)-i), wherein said antibody is recombinantly produced; and

k) a monoclonal antibody that is an antigen-binding fragment of a monoclonal antibody of any one of preceding items a)-j), wherein said fragment retains the capability of specifically binding to said human CD40 antigen;

said antibody or fragment thereof being free of significant agonist activity, and whereby when said antibody or fragment thereof binds to said CD40 antigen on said B cell, the growth or differentiation of said B cell is inhibited.

22. The method of claim 21, wherein said monoclonal antibody binds to said human CD40 antigen with an affinity (K_D) of at least about 10^{-6} M to about 10^{-12} M.

23. The method of claim 21, wherein said fragment is selected from the group consisting of a Fab fragment, an $F(ab')_2$ fragment, an Fv fragment, and a single-chain Fv fragment.

24. The method of claim 21, wherein the cancer is selected from the group consisting of non-Hodgkins lymphoma, chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma, B cell lymphoma, high-grade B cell lymphoma, intermediate-grade B cell lymphoma, low-grade B cell lymphoma, B cell acute lympohoblastic leukemia, myeloblastic leukemia, and Hodgkin's disease.

25. A method for treating an autoimmune disease, comprising administering to a human patient an effective amount of a human anti-CD40 monoclonal antibody selected from the group consisting of:

a) the monoclonal antibody CHIR-5.9 or CHIR-12.12;

b) the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 5.9 or 12.12;

c) a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:6, the sequence shown in SEQ ID NO:7, the sequence shown in SEQ ID NO:8, both the sequence shown in SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:7, and both the sequence shown in SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:8;

d) a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:2, the sequence shown in SEQ ID NO:4, the sequence shown in SEQ ID NO:5, both the sequence shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4, and both the sequence shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:5;

e) a monoclonal antibody having an amino acid sequence encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:1, the sequence shown in SEQ ID NO:3, and both the sequence shown in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:3;

f) a monoclonal antibody that binds to an epitope capable of binding the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 5.9 or 12.12;

g) a monoclonal antibody that binds to an epitope comprising residues 82-87 of the human CD40 sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12;

h) a monoclonal antibody that binds to an epitope comprising residues 82-89 of the human CD40 sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12;

i) a monoclonal antibody that competes with the monoclonal antibody CHIR-5.9 or CHIR-12.12 in a competitive binding assay;

j) the monoclonal antibody of preceding item a) or a monoclonal antibody of any one of preceding items c)-i), wherein said antibody is recombinantly produced; and

k) a monoclonal antibody that is an antigen-binding fragment of a monoclonal antibody of any one of preceding items a)-j), wherein said fragment retains the capability of specifically binding to said human CD40 antigen;

said antibody or fragment thereof being free of significant agonist activity, and whereby when said antibody or fragment thereof binds to said CD40 antigen on said B cell, the growth or differentiation of said B cell is inhibited.

26. The method of claim 25, wherein said monoclonal antibody binds to said human CD40 antigen with an affinity (K_D) of at least about 10^{-6} M to about 10^{-12} M.

27. The method of claim 25, wherein said fragment is selected from the group consisting of a Fab fragment, an $F(ab')_2$ fragment, an Fv fragment, and a single-chain Fv fragment.

28. The method of claim 25, wherein said autoimmune disease is selected from the group consisting of systemic lupus erythematosus, autoimmune thrombocytopenic purpura, Rhematoid arthritis, multiple sclerosis, ankylosing spondylitis, myasthenia gravis, and pemphigus vulgaris.

29. A method for treating a cancer characterized by expression of CD40, comprising administering to a human patient an effective amount of a human anti-CD40 monoclonal antibody selected from the group consisting of:

a) the monoclonal antibody CHIR-5.9 or CHIR-12.12;

b) the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 5.9 or 12.12;

c) a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:6, the sequence shown in SEQ ID NO:7, the sequence shown in SEQ ID NO:8, both the sequence shown in SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:7, and both the sequence shown in SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:8;

d) a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:2, the sequence shown in SEQ ID NO:4, the sequence shown in SEQ ID NO:5, both the sequence shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4, and both the sequence shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:5;

e) a monoclonal antibody having an amino acid sequence encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:1, the sequence shown in SEQ ID NO:3, and both the sequence shown in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:3;

f) a monoclonal antibody that binds to an epitope capable of binding the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 5.9 or 12.12;

g) a monoclonal antibody that binds to an epitope comprising residues 82-87 of the human CD40 sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12;

h) a monoclonal antibody that binds to an epitope comprising residues 82-89 of the human CD40 sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12;

i) a monoclonal antibody that competes with the monoclonal antibody CHIR-5.9 or CHIR-12.12 in a competitive binding assay;

j) the monoclonal antibody of preceding item a) or a monoclonal antibody of any one of preceding items c)-i), wherein said antibody is recombinantly produced; and

k) a monoclonal antibody that is an antigen-binding fragment of a monoclonal antibody of any one of preceding items a)-j), wherein said fragment retains the capability of specifically binding to said human CD40 antigen;

said antibody or fragment thereof being free of significant agonist activity, and whereby when said antibody or fragment thereof binds to said CD40 antigen on said B cell, the growth or differentiation of said B cell is inhibited.

30. The method of claim 29, wherein said monoclonal antibody binds to said human CD40 antigen with an affinity (K_D) of at least about 10^{-6} M to about 10^{-12} M.

31. The method of claim 29, wherein said fragment is selected from the group consisting of a Fab fragment, an $F(ab')_2$ fragment, an Fv fragment, and a single-chain Fv fragment.

32. A method for identifying an antibody that has antagonist activity toward CD40-expressing cells, comprising performing a competitive binding assay with a monoclonal antibody selected from the group consisting of:

a) the monoclonal antibody CHIR-5.9 or CHIR-12.12;

b) the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 5.9 or 12.12;

c) a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:6, the sequence shown in SEQ ID NO:7, the sequence shown in SEQ ID NO:8, both the sequence shown in SEQ

ID NO:6 and SEQ ID NO:7, and both the sequence shown in SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:8;

d) a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:2, the sequence shown in SEQ ID NO:4, the sequence shown in SEQ ID NO:5, both the sequence shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4, and both the sequence shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:5;

e) a monoclonal antibody having an amino acid sequence encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:1, the sequence shown in SEQ ID NO:3, and both the sequence shown in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:3;

f) a monoclonal antibody that binds to an epitope capable of binding the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 5.9 or 12.12;

g) a monoclonal antibody that binds to an epitope comprising residues 82-87 of the human CD40 sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12;

h) a monoclonal antibody that binds to an epitope comprising residues 82-89 of the human CD40 sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12; and

i) the monoclonal antibody of preceding item a) or a monoclonal antibody of any one of preceding items c)-h), wherein said antibody is recombinantly produced; and

j) a monoclonal antibody that is an antigen-binding fragment of a monoclonal antibody of a)-i), wherein said fragment retains the capability of specifically binding to said human CD40 antigen.

33. An antagonist anti-CD40 monoclonal antibody that specifically binds Domain 2 of CD40.

34. The monoclonal antibody of claim 33, wherein said antibody is a human antibody.

35. The monoclonal antibody of claim 34, wherein said antibody is free of significant agonist activity.

36. The monoclonal antibody of claim 33, wherein said antibody has the binding specificity of an antibody selected from the group consisting of the antibody produced by hybridoma cell line 5.9 and the antibody produced by hybridoma cell line 12.12.

37. The monoclonal antibody of claim 33, wherein said antibody is selected from the group consisting of the antibody produced by hybridoma cell line deposited with the ATCC as Patent Deposit No. PTA -5542 and hybridoma cell line deposited with the ATCC as Patent Deposit No. PTA-5543.

38. The monoclonal antibody of claim 33, wherein said antibody has the binding specificity of monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9.

39. The monoclonal antibody of claim 33, wherein said antibody binds to an epitope comprising residues 82-87 of the human CD40 sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12.

40. The monoclonal antibody of claim 33, wherein said antibody is selected from the group consisting of:

a) a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:2, the sequence shown in SEQ ID NO:4, the sequence shown in SEQ ID NO:5, both the sequence shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4, and both the sequence shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:5;

b) a monoclonal antibody having an amino acid sequence encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:1, the sequence shown in SEQ ID NO:3, and both the sequence shown in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:3;

c) a monoclonal antibody that binds to an epitope capable of binding the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 12.12;

d) a monoclonal antibody that binds to an epitope comprising residues 82-87 of the human CD40 sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12;

e) a monoclonal antibody that competes with the monoclonal antibody CHIR-12.12 in a competitive binding assay; and

f) a monoclonal antibody that is an antigen-binding fragment of the CHIR-12.12 monoclonal antibody or the foregoing monoclonal antibodies in preceding items (a)-(e), where the fragment retains the capability of specifically binding to the human CD40 antigen.

41. A method for inhibiting a CD40 ligand-mediated CD40 signaling pathway in a human CD40-expressing cell, said method comprising contacting said cell with an effective amount of a human anti-CD40 monoclonal antibody selected from the group consisting of:

a) the monoclonal antibody CHIR-5.9 or CHIR-12.12;

b) the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 5.9 or 12.12;

c) a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:6, the sequence shown in SEQ ID NO:7, the sequence shown in SEQ ID NO:8, both the sequence shown in SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:7, and both the sequence shown in SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:8;

d) a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:2, the sequence shown in SEQ ID NO:4, the sequence shown in SEQ ID NO:5, both the sequence shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4, and both the sequence shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:5;

e) a monoclonal antibody having an amino acid sequence encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:1, the sequence shown in SEQ ID NO:3, and both the sequence shown in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:3;

f) a monoclonal antibody that binds to an epitope capable of binding the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 5.9 or 12.12;

g) a monoclonal antibody that binds to an epitope comprising residues 82-87 of the human CD40 sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12;

h) a monoclonal antibody that binds to an epitope comprising residues 82-89 of the human CD40 sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12;

i) a monoclonal antibody that competes with the monoclonal antibody CHIR-5.9 or CHIR-12.12 in a competitive binding assay;

j) the monoclonal antibody of preceding item a) or a monoclonal antibody of any one of preceding items c)-i), wherein said antibody is recombinantly produced; and

k) a monoclonal antibody that is an antigen-binding fragment of a monoclonal antibody of any one of preceding items a)-j), wherein said fragment retains the capability of specifically binding to said human CD40 antigen.

42. The method of claim 41, wherein said monoclonal antibody binds to said human CD40 antigen with an affinity (K_D) of at least about 10^{-6} M to about 10^{-12} M.

43. The method of claim 41, wherein said fragment is selected from the group consisting of a Fab fragment, an $F(ab')_2$ fragment, an Fv fragment, and a single-chain Fv fragment.

44. The method of claim 41, wherein said human CD40-expressing cell is a normal human B cell or a malignant human B cell and said CD40 signaling pathway is B cell survival.

45. A pharmaceutical composition comprising a human monoclonal antibody that is capable of specifically binding to a human CD40 antigen expressed on the surface of a human CD40-expressing cell, said monoclonal antibody being free of significant agonist activity, wherein said antibody is selected from the group consisting of:

a) the monoclonal antibody CHIR-5.9 or CHIR-12.12;

b) the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 5.9 or 12.12;

c) a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:6, the sequence shown in SEQ ID NO:7, the sequence shown in SEQ ID NO:8, both the sequence shown in SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:7, and both the sequence shown in SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:8;

d) a monoclonal antibody comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:2, the sequence shown in SEQ ID NO:4, the sequence shown in SEQ ID NO:5, both the sequence shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4, and both the sequence shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:5;

e) a monoclonal antibody having an amino acid sequence encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of the sequence shown in SEQ ID NO:1, the sequence shown in SEQ ID NO:3, and both the sequence shown in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:3;

f) a monoclonal antibody that binds to an epitope capable of binding the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line 5.9 or 12.12;

g) a monoclonal antibody that binds to an epitope comprising residues 82-87 of the human CD40 sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12;

h) a monoclonal antibody that binds to an epitope comprising residues 82-89 of the human CD40 sequence shown in SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12;

i) a monoclonal antibody that competes with the monoclonal antibody CHIR-5.9 or CHIR-12.12 in a competitive binding assay;

j) the monoclonal antibody of preceding item a) or a monoclonal antibody of any one of preceding items c)-i), wherein said antibody is recombinantly produced; and

k) a monoclonal antibody that is an antigen-binding fragment of a monoclonal antibody of any one of preceding items a)-j), wherein said fragment retains the capability of specifically binding to said human CD40 antigen.

46. The pharmaceutical composition of claim 45, wherein said composition is a liquid pharmaceutical formulation comprising a buffer in an amount to maintain the pH of the formulation in a range of about pH 5.0 to about pH 7.0.

47. The pharmaceutical composition of claim 46, wherein said formulation further comprises an isotonizing agent in an amount to render same composition near isotonic.

48. The pharmaceutical composition of claim 47, wherein said isotonizing agent is sodium chloride, said sodium chloride being present in said formulation at a concentration of about 50 mM to about 300 mM.

49. The pharmaceutical composition of claim 48, wherein said sodium chloride is present is said formulation at a concentration of about 150 mM.

50. The pharmaceutical composition of any one of claims 46 to 49, wherein said buffer is selected from the group consisting of succinate, citrate, and phosphate buffers.

51. The pharmaceutical composition of claim 50, wherein said formulation comprises said buffer at a concentration of about 1 mM to about 50 mM.

52. The pharmaceutical composition of claim 51, wherein said buffer is sodium succinate or sodium citrate at a concentration of about 5 mM to about 15 mM.

53. The pharmaceutical composition of any one of claims 46 to 52, wherein said formulation further comprises a surfactant in an amount from about 0.001% to about 1.0%.

54. The pharmaceutical composition of claim 53, wherein said surfactant is polysorbate 80, which is present in said formulation in an amount from about 0.001% to about 0.5%.

ABSTRACT OF THE DISCLOSURE

Methods of therapy for treating diseases mediated by stimulation of CD40 signaling on CD40-expressing cells are provided. The methods comprise administering a therapeutically effective amount of an antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof to a patient in need thereof. The antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof is free of significant agonist activity, but exhibits antagonist activity when the antibody binds a CD40 antigen on a human CD40-expressing cell. Antagonist activity of the anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof beneficially inhibits proliferation and/or differentiation of human CD40-expressing cells, such as B cells.

FIGURE 1A

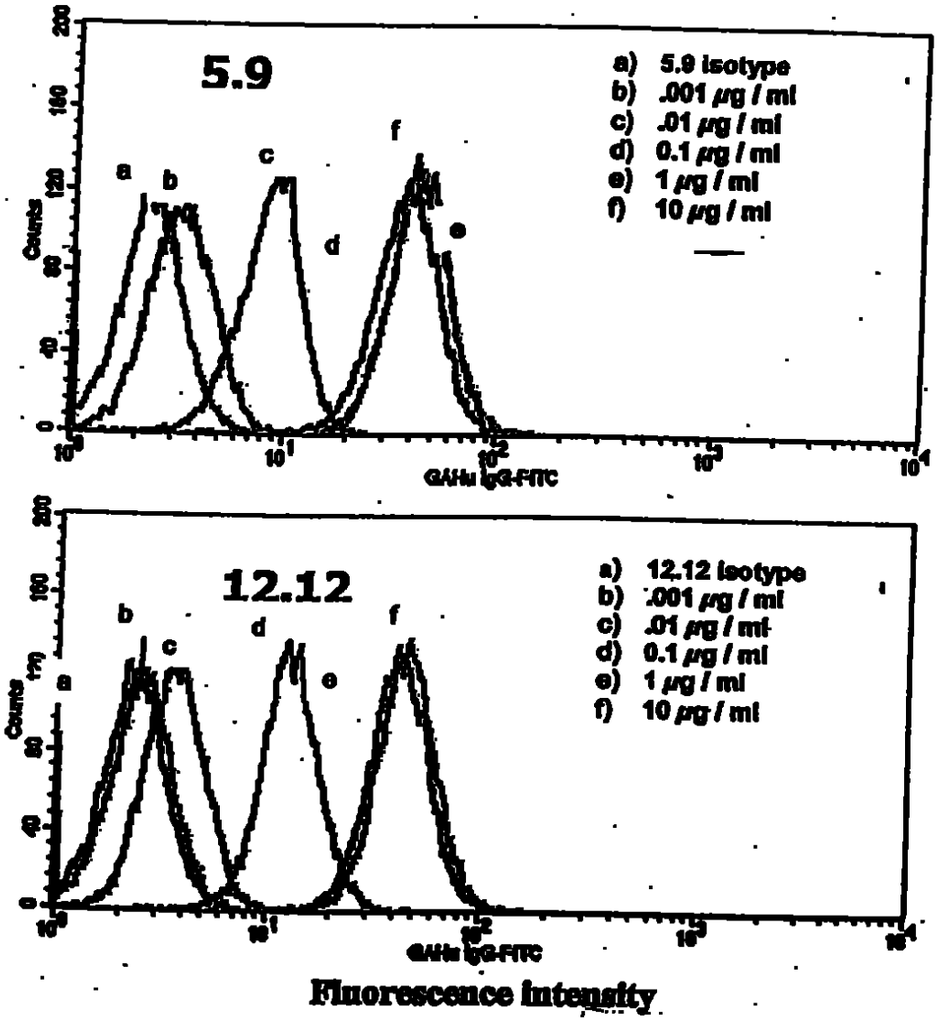


FIGURE 1B

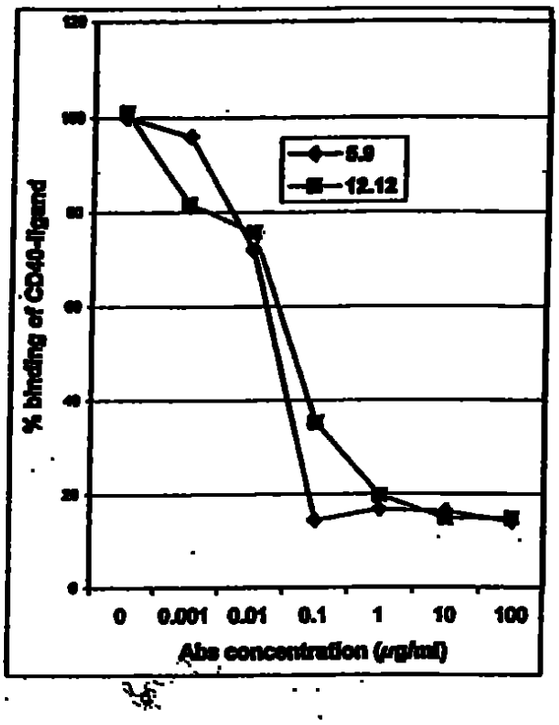

% binding of CD40-ligand
5.9
12.12
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Abs concentration (µg/ml)

FIGURE 2A

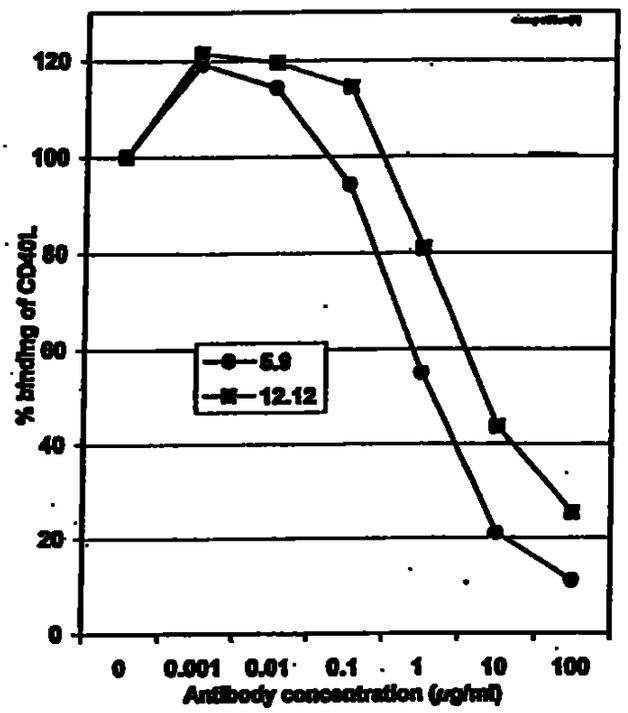

120
100
80
60
40
20
0
% binding of CD40L
5.9
12.12
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Antibody concentration (µg/ml)

FIGURE 2B

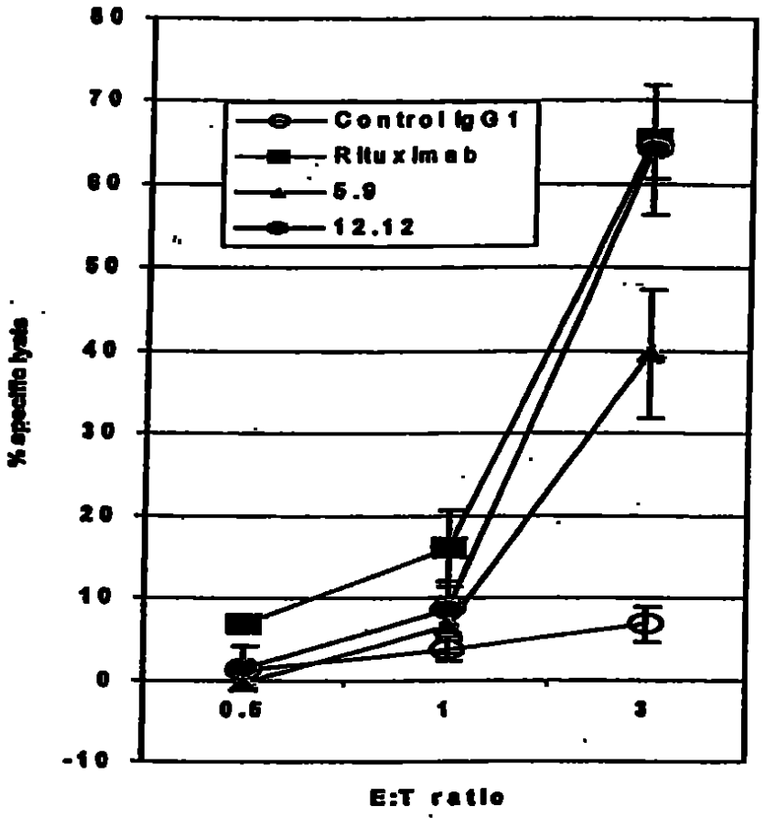

80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
% specific lysis
Control IgG1
Rituximab
5.9
12.12
0.5
1
3
E:T ratio

FIGURE 3A

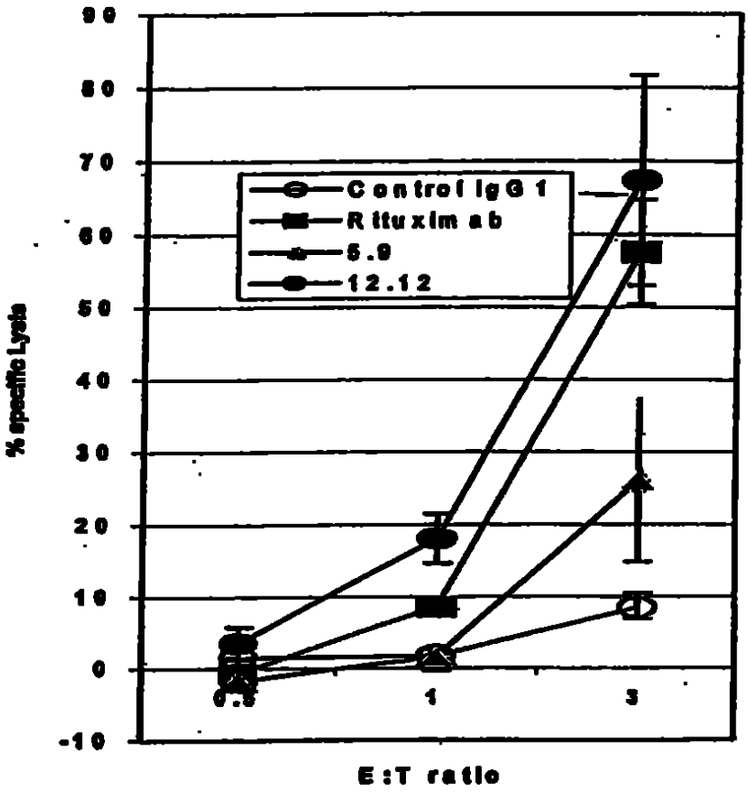

90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
% specific Lysis
Control IgG 1
Rituximab
5.9
12.12
0.3
1
3
E:T ratio

FIGURE 3B

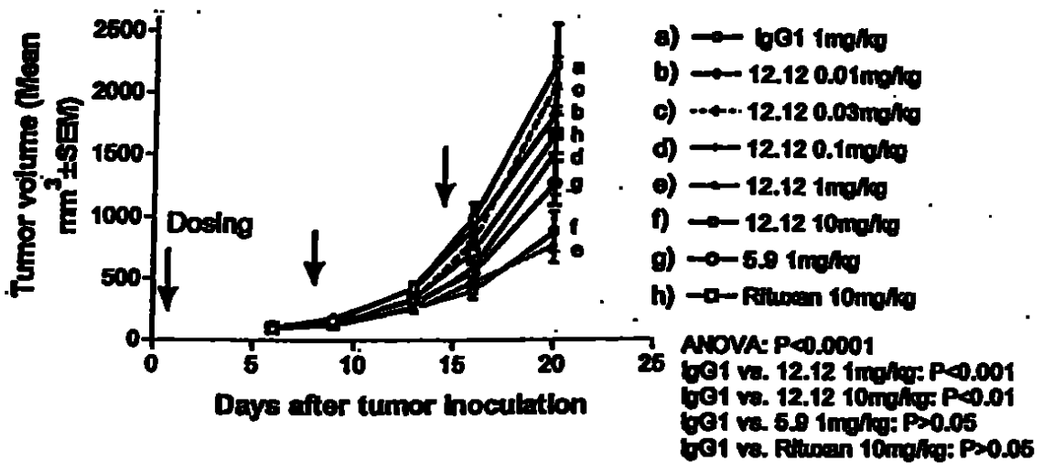

Tumor volume (Mean mm³ ±SEM)
2500
2000
1500
1000
500
0
Dosing
0
5
10
15
20
25
Days after tumor inoculation
a
c
b
h
d
g
f
e
a) IgG1 1mg/kg
b) 12.12 0.01mg/kg
c) 12.12 0.03mg/kg
d) 12.12 0.1mg/kg
e) 12.12 1mg/kg
f) 12.12 10mg/kg
g) 5.9 1mg/kg
h) Rituxan 10mg/kg
ANOVA: P<0.0001
IgG1 vs. 12.12 1mg/kg: P<0.001
IgG1 vs. 12.12 10mg/kg: P<0.01
IgG1 vs. 5.9 1mg/kg: P>0.05
IgG1 vs. Rituxan 10mg/kg: P>0.05

FIGURE 4

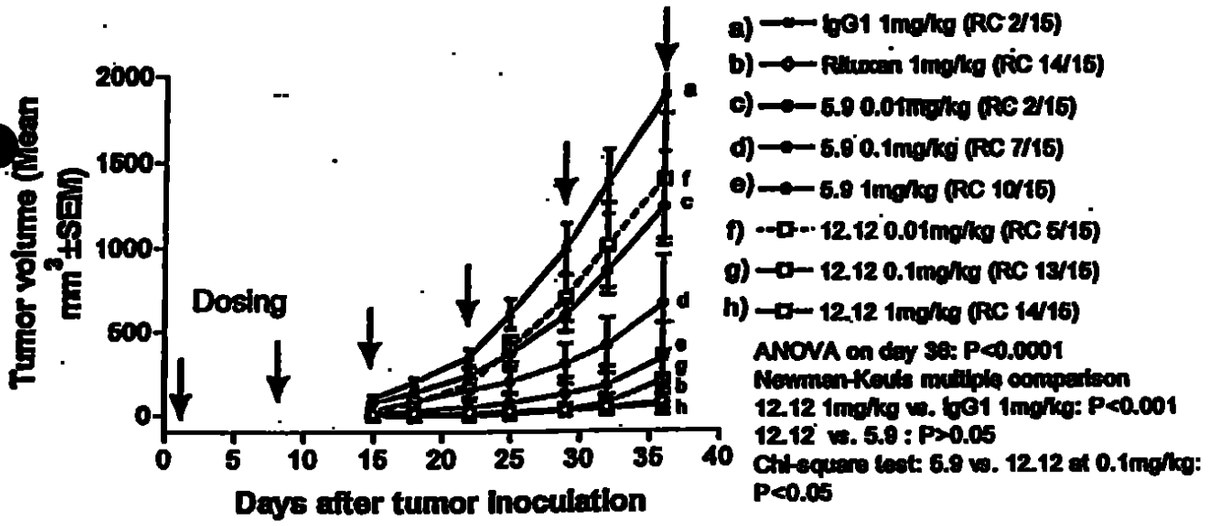
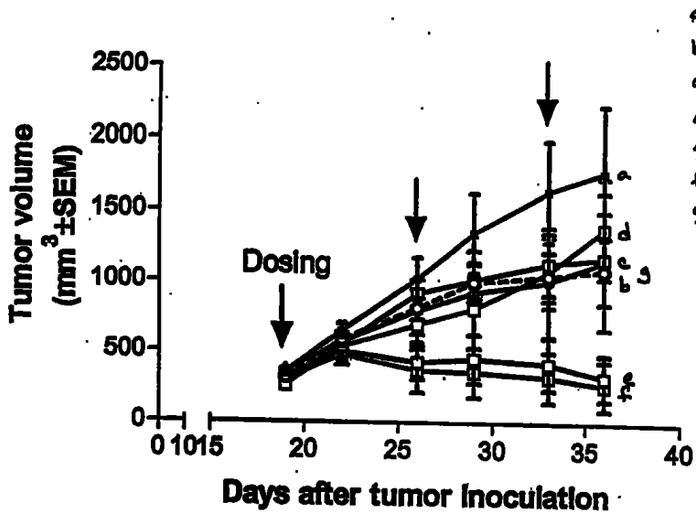

Tumor volume (Mean mm³ ±SEM)
2000
1500
1000
500
0
Dosing
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Days after tumor inoculation
a
f
c
d
e
g
b
h
a) IgG1 1mg/kg (RC 2/15)
b) Rituxan 1mg/kg (RC 14/15)
c) 5.9 0.01mg/kg (RC 2/15)
d) 5.9 0.1mg/kg (RC 7/15)
e) 5.9 1mg/kg (RC 10/15)
f) 12.12 0.01mg/kg (RC 5/15)
g) 12.12 0.1mg/kg (RC 13/15)
h) 12.12 1mg/kg (RC 14/15)
ANOVA on day 38: P<0.0001
Newman-Keuls multiple comparison
12.12 1mg/kg vs. IgG1 1mg/kg: P<0.001
12.12 vs. 5.9 : P>0.05
Chi-square test: 5.9 vs. 12.12 at 0.1mg/kg:
P<0.05

FIGURE 5



a) hIgG1 1mpk (2/10 CR)
b) Rituxan 1mpk (0/10 CR)
c) 12.12 0.01mpk (2/10 CR)
d) 12.12 0.1mpk (3/10 CR)
e) 12.12 1mpk (6/10 CR)
f) 12.12 10mpk (6/10 CR)
g) 5.9 1mpk (4/10 CR)

ANOVA: P=0.023
hIgG1 vs. 12.12 1mpk: P<0.05
hIgG1 vs. 12.12 10mpk: P<0.05

Chi-square test for Complete Regression:
Rituxan vs. 12.12 1mpk: P=0.0034
Rituxan vs. 12.12 10mpk: P=0.0034
Rituxan vs. 5.9 1mpk: P=0.0253

8/16

FIGURE 6

Number of CD20 and CD40 Molecules on Namalwa and Daudii Cells

Methods:

1. Harvest and wash cells once with PBS w/o Ca++/Mg++ plus 0.5%BSA and 0.1% Sodium Azide.
2. Block 1e6 cells with 10% huSerum in PBS w/o Ca++/Mg++ plus 0.1% Sodium Azide on ice for 30 minutes.
3. Stain cells with FITC conjugated antibodies (12.12-FITC or Rituximab-FITC) on ice for 40minutes. Cells were also stained with huIgG1-FITC for non-specific binding control. Antibody concentrations were 0.01, 0.1, 1, 10 and 100ug per ml.
4. Determine Mean Channel Fluorescence (Geometric Mean) by flow cytometer using log amplifier. PI was added to exclude dead cells.
5. Determine Mean Channel Fluorescence (Geometric Means) of Quantum™24FITC (3,000 to 6,000 MESF*), Quantum™[25]FITC (60,000 to 2,000,000 MESF) and Quantum™26FITC (10,000 to 800,000 MESF) at the same instrument settings as for samples analyzed.

MESF: Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome

6. Construct calibration curve by plotting MESF (y-axis) vs. the Geometric Means (x-axis).
7. The number of molecules per cell was determined using the following equation: $y=ax^b$ where y is equal to MESF and x is equal to Mean Channel Fluorescence of the sample. Mean Channel Fluorescence used for each sample was the Geo Mean at saturation concentration (12.12FITC) or the highest concentration (rituximabFITC).
8. DNding MESF of sample by the numbers of FITC molecules conjugated to each antibody (F:P ratio) to determine the antibody binding capacity (ABC). ABC of huIgGFITC of respected sample was corrected to obtain the final antibody binding capacity.

9/16

	Daudii		Namalwa	
Exp.	CD40	CD20	CD40	CD20
E090403	14403.0	93676.5	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	128158.3	3164.9	4618.0
Average	13,649.9	107,695.6	3,177.1	4,898.7
Stdev	546.7	14915.9	88.8	933.4

FIGURE 7

164

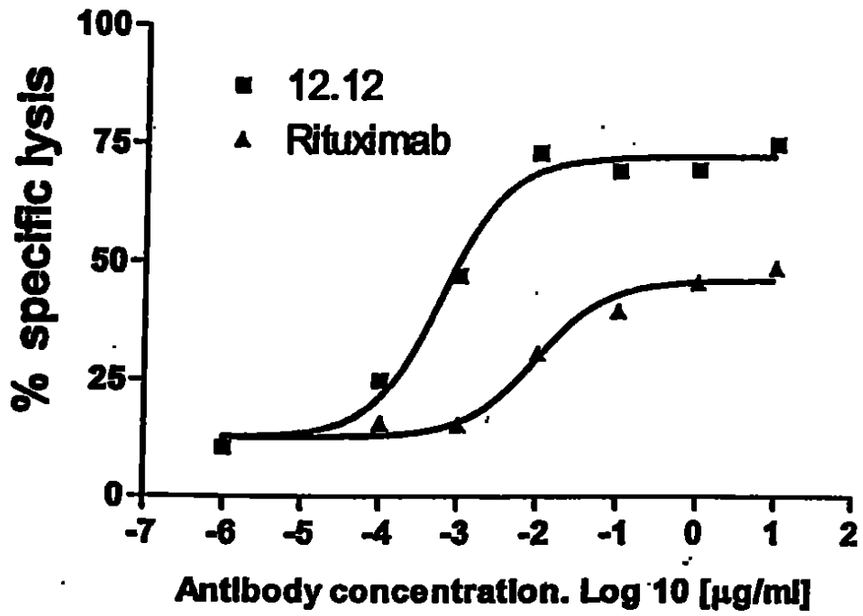

100
75
50
25
0
% specific lysis
12.12
Rituximab
-7
-6
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Antibody concentration. Log 10 [µg/ml]

FIGURE 8

FIGURE 9A

CHIR 12.12 light chain:

leader:

MALPAQLLGLLMLWVSGSSG

variable:

DIVMTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQVLISLGSNRASG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQARQTPFTFGPGTKVDIR

constant:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIGURE 9B

CHIR-12.12 heavy chain:

leader:

MEFGLSWVFLVAILRGVQC

variable:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYEESNRYHAD
SVKGRFTISRDNSKITLYLQMNSLRTEDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGTLVTVSS

constant:

ASTKGPSVFPLAPASKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

alternative constant region:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURE 10A

DNA sequence of light chain of CHIR-12.12:

5'atggcgctccctgctcagctcctggggctgctaatgctctgggtctctggatccagtggggatattgtgatgactcagtctccactctc
cctgaccgtcacccctggagagccggcctccatctcctgcaggtccagtcagagcctcctgtatagtaatggatacaactatttggattg
gtacctgcagaagccagggcagtctccacaggtcctgatctcttgggttctaatcgggcctccggggtccctgacaggttcagtggca
gtggatcaggcacagattttacactgaaaatcagcagagtggaggctgaggatgttggggttattactgcatgcaagctcgacaaact
ccattcactttcggccctgggaccaaagtggatatcagacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagt
tgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctcc
aatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaa
agcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggg
gagagtgttag3'

FIGURE 10B

DNA sequence of heavy chain of CHIR-12.12 (including introns):

5'atggagtttgggctgagctgggttttccttgttgctattttaagaggtgtccagtgtcaggtgcagttggtggagtctgggggaggcgt
ggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtagctatggcatgcactgggtccgccaggctc
caggcaaggggctggagtgggtggcagttatatcatatgaggaaagtaatagataccatgcagactccgtgaagggccgattcacca
tctccagagacaattccaagatcacgctgtatctgcaaatgaacagcctcagaactgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagat
gggggtatagcagcacctgggcctgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcaagtaccaagggcccatccgt
cttccccctggcgcccgctagcaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccgg
tgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcag
cagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtgg
acaagagagttggtgagaggccagcacagggagggagggtgtctgctggaagccaggctcagcgctcctgcctggacgcatcccg
gctatgcagtcccagtccagggcagcaaggcaggccccgtctgcctcttcacccggaggcctctgcccgccccactcatgctcagg
gagagggtcttctggcttttccccaggctctgggcaggcacaggctaggtgcccctaacccaggccctgcacacaaaggggcaggt
gctgggctcagacctgccaagagccatatccgggaggaccctgccccgacctaagcccaccccaaaggccaaactctccactccc
tcagctcggacaccttctctcctcccagattccagtaactcccaatcttctctctgcagagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgc
ccaccgtgcccaggtaagccagcccaggcctcgccctccagctcaaggcgggacaggtgccctagagtagcctgcatccagggac
aggccccagccgggtgctgacacgtccacctccatctcttcctcagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccc
aaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtca
agttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgt
ggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccc
ccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggtgggacccgtggggtgcgagggccacatggacagaggccggctcggcccaccc
tctgccctgagagtgaccgctgtaccaacctctgtccctacagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgg
gaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatccgtggagtgggagagcaa
tgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctatagcaagctcaccgtggac
aagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcc
ctgtctccgggtaaatga3'

FIGURE 11A

CHIR-5.9 light chain:

leader:

MALLAQLLGLLMLWVPGSSG

variable:

AIVMTQPPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWLQQRPGQPPRLLIYKFFRRLSG
VPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQVTQFPHTFGQGTRLEIK

constant:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIGURE 11B

CHIR-5.9 heavy chain:

leader:

MGSTAILALLLAVLQGVCA

variable:

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSP
SFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGTAAGRDYYYYYGMDVWGQGTTVTVS
S

constant:

ASTKGPSVFPLAPASKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

alternative constant region:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURE 12A

Coding sequence for short isoform of human CD40:

```
  1 atggttcgtc tgcctctgca gtgcgtcctc tggggctgct tgctgaccgc tgtccatcca
 61 gaaccaccca ctgcatgcag agaaaaacag tacctaataa acagtcagtg ctgttctttg
121 tgccagccag gacagaaact ggtgagtgac tgcacagagt tcactgaaac ggaatgcctt
181 ccttgcggtg aaagcgaatt cctagacacc tggaacagag agacacactg ccaccagcac
241 aaatactgcg accccaacct agggcttcgg gtccagcaga agggcacctc agaaacagac
301 accatctgca cctgtgaaga aggctggcac tgtacgagtg aggcctgtga gagctgtgtc
361 ctgcaccgct catgctcgcc cggctttggg gtcaagcaga ttgctacagg ggtttctgat
421 accatctgcg agccctgccc agtcggcttc ttctccaatg tgtcatctgc tttcgaaaaa
481 tgtcaccctt ggacaaggtc cccaggatcg gctgagagcc ctggtggtga tccccatcat
541 cttcgggatc ctgtttgcca tcctcttggt gctggtcttt atcaaaaagg tggccaagaa
601 gccaaccaat aa
```

FIGURE 12B

Encoded short isoform of human CD40:

```
  1 mvrlpiqcvl wgclltavhp epptacrekq ylinsqccsl cqpgqklvsd ctefletecl
 61 pcgesefldt wnrethchqh kycdpnlglr vqqkgtsetd tictccegwh ctseacescv
121 lhrscspgfg vkqiatgvsd ticepcpvgf fsnvssafek chpwtrspgs aespggdphh
181 lrdpvchplg aglyqkggqe anq
```

FIGURE 12C

Coding sequence for long isoform of human CD40:

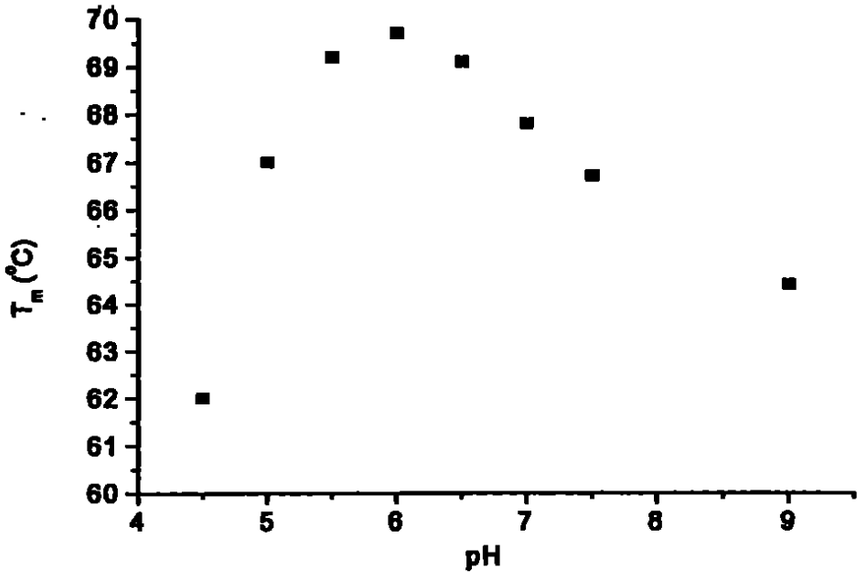
```
  1 atggttcgtc tgcctctgca gtgcgtcctc tggggctgct tgctgaccgc tgtccatcca
 61 gaaccaccca ctgcatgcag agaaaaacag tacctaataa acagtcagtg ctgttctttg
121 tgccagccag gacagaaact ggtgagtgac tgcacagagt tcactgaaac ggaatgcctt
181 ccttgcggtg aaagcgaatt cctagacacc tggaacagag agacacactg ccaccagcac
241 aaatactgcg accccaacct agggcttcgg gtccagcaga agggcacctc agaaacagac
301 accatctgca cctgtgaaga ggctggcac tgtacgagtg aggcctgtga gagctgtgtc
361 ctgcaccgct catgctcgcc cggctttggg gtcaagcaga ttgctacagg ggtttctgat
421 accatctgcg agccctgccc agtcggcttc ttctccaatg tgtcatctgc tttcgaaaaa
481 tgtcaccctt ggacaagctg tgagaccaaa gacctggttg tgcaacaggc aggcacaaac
541 aagactgatg ttgtctgtgg tccccaggat cggctgagag ccctggtggt gatccccatc
601 atcttcggga tcctgtttgc catcctcttg gtgctggtct ttatcaaaaa ggtggccaag
661 aagccaacca ataaggcccc ccaccccaag caggaacccc aggagatcaa ttttcccgac
721 gatcttcctg gctccaacac tgctgctcca gtgcaggaga ctttacatgg atgccaaccg
781 gtcacccagg aggatggcaa agagagtcgc atctcagtgc aggagagaca gtga
```

FIGURE 12D

Encoded long isoform of human CD40:

```
  1 mvrlplqcvl wgclltavhp epptacrekq ylinsqccsl cqpgqklvsd ctefteteci
 61 pcgesefldt wnrethchqh kycdpnlglr vqqkgtsetd tictceegwh ctseacescv
121 lhrscspgfg vkqiatgvsd ticepcpvgf fsnvssafek chpwtscetk dlvvqqagtn
181 ktdvvcgpqd rlralvvipi ifgilfaill vlvfikkvak kptnkaphpk qepqeinfpd
241 dlpgsntaap vqetlhgcqp vtqedgkesr isvqerq
```

FIGURE 13



SEQUENCE LISTING

<110> Chen, Bao-Lu
Hurst, Deborah
Lee, Sang Hoon
Long, Li
Lu, Xiaofeng
Luqman, Mohammad
Yabannavar, Asha
Zaror, Isabel

<120> Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use

<130> PP20107.004 (282916)

<150> 60/565,710
<151> 2004-04-27

<150> 60/525,579
<151> 2003-11-26

<150> 60/517,337
<151> 2003-11-04

<160> 12

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 720
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Coding sequence for light chain of 12.12 human anti-CD40 antibody

<221> CDS
<222> (1)...(720)

<400> 1

```
atg gcg ctc cct gct cag ctc ctg ggg ctg cta atg ctc tgg gtc tct   48
Met Ala Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
 1               5                  10                  15

gga tcc agt ggg gat att gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg acc   96
Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Thr
            20                  25                  30

gtc acc cct gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tcc agt cag agc   144
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
        35                  40                  45

ctc ctg tat agt aat gga tac aac tat ttg gat tgg tac ctg cag aag   192
Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys
    50                  55                  60

cca ggg cag tct cca cag gtc ctg atc tct ttg ggt tct aat cgg gcc   240
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Val Leu Ile Ser Leu Gly Ser Asn Arg Ala
65                  70                  75                  80

tcc ggg gtc cct gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt   288
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
```

```
                85                  90                  95

aca ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac   336
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
            100                 105                 110

tgc atg caa gct cga caa act cca ttc act ttc ggc cct ggg acc aaa   384
Cys Met Gln Ala Arg Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
        115                 120                 125

gtg gat atc aga cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg   432
Val Asp Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
    130                 135                 140

cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg   480
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145                 150                 155                 160

ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat   528
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
                165                 170                 175

aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac   576
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
            180                 185                 190

agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa   624
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
        195                 200                 205

gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag   672
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
    210                 215                 220

ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag   720
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  *
225                 230                 235
```

<210> 2
<211> 239
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Light chain of 12.12 human anti-CD40 antibody

<400> 2

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

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

<210> 3
<211> 2016
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Coding sequence for heavy chain of 12.12 human anti-CD40 antibody (with introns)

<400> 3

```
atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctt gtt gct att tta aga ggt    48
gtc cag tgt cag gtg cag ttg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag    96
cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc   144
agt agc tat ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg   192
gag tgg gtg gca gtt ata tca tat gag gaa agt aat aga tac cat gca   240
gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag atc   288
acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctc aga act gag gac acg gct gtg   336
tat tac tgt gcg aga gat ggg ggt ata gca gca cct ggg cct gac tac   384
tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca gca agt acc aag ggc   432
cca tcc gtc ttc ccc ctg gcg ccc gct agc aag agc acc tct ggg ggc   480
aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg   528
acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc   576
ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg   624
acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg   672
aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt ggt gag agg   720
cca gca cag gga ggg agg gtg tct gct gga agc cag gct cag cgc tcc   768
tgc ctg gac gca tcc cgg cta tgc agt ccc agt cca ggg cag caa ggc   816
agg ccc cgt ctg cct ctt cac ccg gag gcc tct gcc cgc ccc act cat   864
gct cag gga gag ggt ctt ctg gct ttt tcc cca ggc tct ggg cag gca   912
cag gct agg tgc ccc taa ccc agg ccc tgc aca caa agg ggc agg tgc   960
tgg gct cag acc tgc caa gag cca tat ccg gga gga ccc tgc ccc tga  1008
cct aag ccc acc cca aag gcc aaa ctc tcc act ccc tca gct cgg aca  1056
cct tct ctc ctc cca gat tcc agt aac tcc caa tct tct ctc tgc aga  1104
gcc caa atc ttg tga caa aac tca cac atg ccc acc gtg ccc agg taa  1152
gcc agc cca ggc ctc gcc ctc cag ctc aag gcg gga cag gtg ccc tag  1200
agt agc ctg cat cca ggg aca ggc ccc agc cgg gtg ctg aca cgt cca  1248
cct cca tct ctt cct cag cac ctg aac tcc tgg ggg gac cgt cag tct  1296
tcc tct tcc ccc caa aac cca agg aca ccc tca tga tct ccc gga ccc  1344
ctg agg tca cat gcg tgg tgg tgg acg tga gcc acg aag acc ctg agg  1392
tca agt tca act ggt acg tgg acg gcg tgg agg tgc ata atg cca aga  1440
caa agc cgc ggg agg agc agt aca aca gca cgt acc gtg tgg tca gcg  1488
tcc tca ccg tcc tgc acc agg act ggc tga atg gca agg agt aca agt  1536
gca agg tct cca aca aag ccc tcc cag ccc cca tcg aga aaa cca tct  1584
cca aag cca aag gtg gga ccc gtg ggg tgc gag ggc cac atg gac aga  1632
ggc cgg ctc ggc cca ccc tct gcc ctg aga gtg acc gct gta cca acc  1680
tct gtc cct aca ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc  1728
cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg  1776
gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat  1824
ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc  1872
gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg  1920
tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg  1968
```

cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 2016

<210> 4
<211> 469
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy chain of 12.12 human anti-CD40 antibody

<400> 4

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

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
435 440 445
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
450 455 460
Leu Ser Pro Gly Lys
465

<210> 5
<211> 469
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy chain of variant of 12.12 human anti-CD40 antibody

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

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

<210> 6
<211> 239
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Light chain of 5.9 human anti-CD40 antibody

<400> 6
Met Ala Leu Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Pro
1 5 10 15
Gly Ser Ser Gly Ala Ile Val Met Thr Gln Pro Pro Leu Ser Ser Pro
20 25 30
Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
35 40 45
Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg
50 55 60
Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Phe Phe Arg Arg Leu
65 70 75 80
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe
85 90 95
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110
Cys Met Gln Val Thr Gln Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg
115 120 125
Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180 185 190
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 7
<211> 474
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heavy chain of 5.9 human anti-CD40 antibody

<400> 7
Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu Ala Leu Leu Leu Ala Val Leu Gln Gly
1 5 10 15

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

<210> 8
<211> 474
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy chain of variant of 5.9 human anti-CD40 antibody

<400> 8

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

<210> 9
<211> 612
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(612)

<221> misc_feature
<222> (0)...(0)
<223> Coding sequence for short isoform of human CD40

<400> 9

```
atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctc tgg ggc tgc ttg ctg acc   48
Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
 1               5                  10                  15

gct gtc cat cca gaa cca ccc act gca tgc aga gaa aaa cag tac cta   96
Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu
            20                  25                  30

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

agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc ctt cct tgc ggt gaa   192
Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu
    50                  55                  60

agc gaa ttc cta gac acc tgg aac aga gag aca cac tgc cac cag cac   240
Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His
65                  70                  75                  80

aaa tac tgc gac ccc aac cta ggg ctt cgg gtc cag cag aag ggc acc   288
Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr
                85                  90                  95

tca gaa aca gac acc atc tgc acc tgt gaa gaa ggc tgg cac tgt acg   336
Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
            100                 105                 110

agt gag gcc tgt gag agc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tcg ccc ggc   384
Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
        115                 120                 125

ttt ggg gtc aag cag att gct aca ggg gtt tct gat acc atc tgc gag   432
Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
    130                 135                 140

ccc tgc cca gtc ggc ttc ttc tcc aat gtg tca tct gct ttc gaa aaa   480
Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
145                 150                 155                 160

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

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

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

<210> 10
<211> 203
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

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

<210> 11
<211> 834
<212> DNA
<213> Homo sapiens

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

<221> misc_feature
<222> (0)...(0)
<223> Coding sequence for long isoform of human CD40

<400> 11

```
atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctc tgg ggc tgc ttg ctg acc   48
Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
 1               5                  10                  15

gct gtc cat cca gaa cca ccc act gca tgc aga gaa aaa cag tac cta   96
Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu
            20                  25                  30

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

agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc ctt cct tgc ggt gaa   192
Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu
    50                  55                  60

agc gaa ttc cta gac acc tgg aac aga gag aca cac tgc cac cag cac   240
```

```
Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His
 65                  70                  75                  80

aaa tac tgc gac ccc aac cta ggg ctt cgg gtc cag cag aag ggc acc   288
Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr
                85                  90                  95

tca gaa aca gac acc atc tgc acc tgt gaa gaa ggc tgg cac tgt acg   336
Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
            100                 105                 110

agt gag gcc tgt gag agc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tcg ccc ggc   384
Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
        115                 120                 125

ttt ggg gtc aag cag att gct aca ggg gtt tct gat acc atc tgc gag   432
Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
    130                 135                 140

ccc tgc cca gtc ggc ttc ttc tcc aat gtg tca tct gct ttc gaa aaa   480
Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
145                 150                 155                 160

tgt cac cct tgg aca agc tgt gag acc aaa gac ctg gtt gtg caa cag   528
Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln
                165                 170                 175

gca ggc aca aac aag act gat gtt gtc tgt ggt ccc cag gat cgg ctg   576
Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu
            180                 185                 190

aga gcc ctg gtg gtg atc ccc atc atc ttc ggg atc ctg ttt gcc atc   624
Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile
        195                 200                 205

ctc ttg gtg ctg gtc ttt atc aaa aag gtg gcc aag aag cca acc aat   672
Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn
    210                 215                 220

aag gcc ccc cac ccc aag cag gaa ccc cag gag atc aat ttt ccc gac   720
Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp
225                 230                 235                 240

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

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

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


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

<400> 12
Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
 1               5                  10                  15
Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu
            20                  25                  30
```

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

PATENT COOPERATION TREA

too /file 282916

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

To:
CHIRON CORPORATION
Intellectual Property Department
Attn. Alexander, Lisa E.
P.O. Box 8097
Emeryville, CA 94662-8097
UNITED STATES OF AMERICA

Date of mailing (day/month/year)	20/06/2005
Applicant's or agent's file reference: PP20107.004	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No.: PCT/US2004/037152	International filing date (day/month/year): 04/11/2004
Applicant: CHIRON CORPORATION	

Received JUN 2005 Chiron Corporation Intellectual Property

1. [x] The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

   Filing of amendments and statement under Article 19:
   The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

   When? The time limit for filing such amendments is normally 2 months from the date of transmittal of the International Search Report; however, for more details, see the notes on the accompanying sheet.

   Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes, 1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

   For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. [ ] The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. [ ] With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

   [ ] the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

   [ ] no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. **Reminders**

   Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90*bis*.1 and 90*bis*.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

   The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

   Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

   In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

   See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

DOCKETED on/by SZL 7-6-05
Atty: LEA PA
File # PP020107.0004
Due Date _____ Ext _____
Final Date 8-20-05 DLE Ad: 19
9-20-05 RSD. Wr: 9

Name and mailing address of the International Searching Authority:
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

DOCKETED Micheala Digiulio
By 9/6/05
Date 9/6/05

Form PCT/ISA/220 (January 2004) *(See notes on accompanying sheet)*

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under Article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the PCT Applicant's Guide, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When? Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How? Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

INSTEAD SHEET (RULE 26) IRA/EP/EPA/1 ( )

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

(i) the claim is unchanged;

(ii) the claim is cancelled;

(iii) the claim is new;

(iv) the claim replaces one or more claims as filed;

(v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."

2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."

3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."

4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international appplication is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the same time of filing the amendments with the International Bureau, also file a copy of such amendments with the International Preliminary Examining Authority (see Rule 62.2(a), first sentence).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, where upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

BNSDOCID: <XB__ ...ISA220NOENP4 I >

( ) PATENT COOPERATION TREA( )

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
PP20107.004		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US2004/037152	04/11/2004	04/11/2003
Applicant		
CHIRON CORPORATION		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 6 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
      [ ] The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).
   b. [X] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. [X] Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3. [ ] Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,
   [X] the text is approved as submitted by the applicant.
   [ ] the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,
   [X] the text is approved as submitted by the applicant.
   [ ] the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,
   a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
      [ ] as suggested by the applicant.
      [ ] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
      [ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
   b. [X] none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/037152

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. type of material

   [X] a sequence listing

   [ ] table(s) related to the sequence listing

   b. format of material

   [X] in written format

   [X] in computer readable form

   c. time of filing/furnishing

   [ ] contained in the international application as filed

   [ ] filed together with the international application in computer readable form

   [X] furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/037152

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K39/395 C12N5/20 A61P33/06 A61P35/02
//C07K16/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/28904 A (CHIRON CORPORATION; CHU, KETING; WANG, CHANGYU; YOSHIHARA, CORRINE; DO) 11 April 2002 (2002-04-11) pages 1,9 page 30	1-54
X	WO 01/83755 A (GEMINI SCIENCE, INC; MIKAYAMA, TOSHIFUMI; TAKAHASHI, NOBUAKI; CHEN, XI) 8 November 2001 (2001-11-08) page 2 - page 3 page 10 - page 13; figure 1	1-54
X	WO 02/088186 A (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA; MIKAYAMA, TOSHIFUMI; YOSHIDA, HITOSHI; FO) 7 November 2002 (2002-11-07) example 14	1-54

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 April 2005	20/06/2005

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Wagner, R

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	-& EP 1 391 464 A (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA) 25 February 2004 (2004-02-25) example 14	1-54
A	ELLMARK PETER ET AL: "Modulation of the CD40-CD40 ligand interaction using human anti-CD40 single-chain antibody fragments obtained from the n-CoDeR phage display library" IMMUNOLOGY, vol. 106, no. 4, August 2002 (2002-08), pages 456-463, XP002326342 ISSN: 0019-2805 figures 1,3	1-54
A	HAGER A -C MALMBORG ET AL: "Affinity and epitope profiling of mouse anti-CD40 monoclonal antibodies." SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 57, no. 6, June 2003 (2003-06), pages 517-524, XP002326343 ISSN: 0300-9475 the whole document	1-11, 33-40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/037152

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 12-31,41-44 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing *(day/month/year)* see form PCT/ISA/210 (second sheet)	
Applicant's or agent's file reference see form PCT/ISA/220	FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2004/037152.	04.11.2004	04.11.2003

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
A61K39/395, C12N5/20, A61P33/06, A61P35/02

Applicant
CHIRON CORPORATION

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later. 9-20-05 9-4-05

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:	Authorized Officer
European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Wagner, R Telephone No. +49 89 2399-7357

Form (PCT/ISA/237) (Cover Sheet) (January 2004)

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2004/037152

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

   ☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).

2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

   a. type of material:

   ☒ a sequence listing

   ☐ table(s) related to the sequence listing

   b. format of material:

   ☒ in written format

   ☒ in computer readable form

   c. time of filing/furnishing:

   ☐ contained in the international application as filed.

   ☐ filed together with the international application in computer readable form.

   ☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

4. Additional comments:

   see separate sheet

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2004/037152

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 12-31,41-44

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 12-31,41-44 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination *(specify)*:

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings *(indicate particular elements below)* or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.

☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:

the written form	☐	has not been furnished
	☐	does not comply with the standard
the computer readable form	☐	has not been furnished
	☐	does not comply with the standard

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.

☐ See separate sheet for further details

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2004/037152

Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	2-4,6-54
	No:	Claims	1,5
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-54
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-11,32-40,45-54
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (SEPARATE SHEET)

International application No.
PCT/US2004/037152

Re Item I
Basis of the report

The sequence listing filed according to the required specifications was filed after the filing date and is therefore not considered as being part of the description (Rule 13ter.1 (f) PCT).

Re Item III
Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

Claims 12-31, 41-44 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. In some of said methods an in vivo use cannot be excluded. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

Re Item V
Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Reference is made to the following documents/
D1: WO01/83755
D2: WO02/28904
D3: WO02/88186 (EP1391464)
D4: Ellmark et al., Immunology, 2002;106; pp. 456-463

2. For the assessment of the present claims 12-31,41-44 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

3. Claim 1 is directed to a human antibody, binding to human CD40, without agonist activity and wherein said monoclonal antibody exhibits increased anti-tumor activity relative to an equivalent amount of the monoclonal chimeric anti-CD20 (Rituxan®), wherein the anti-tumor activity is assayed in a staged nude mouse xenograft tumor model using the Daudi human B cell lymphoma cell line. The functional feature relating to the comparison in said precise system, of the anti-tumor activity to the activity of an antibody directed against a different target (CD20) is not a parameter recognized in the art (see GL- 5.36) and renders the claim unclear (Article 6 PCT). The use of said unusual parameter does not allow the comparison of the claimed subject-matter to the antagonist anti-CD40 antibodies of the prior art and therefore the said parameter cannot be taken into consideration when the novelty of claim 1 is determined.

4. D1 discloses human anti-CD40 antibodies, which are a antagonists (page 9, lines 20-25). In view of the previous objection regarding the validity of the unusual parameter, D1 is considered to anticipate the subject-matter of claim 1 (Article 33(2) PCT). D1 discloses also the use of the anti-CD40 antibodies in the treatment of cancer (page 30, lines 1-7) and autoimmune diseases like lupus and rheumatoid arthritis (page 1). Thus the subject-matter of claims 1, 5 is not new (Article 33(2) PCT). The additional feature of independent claim 3 does not confer an inventive step on the antibody because the claimed range of affinity parameters is within the range of affinities expected for a monoclonal antibody. The subject-matter of claims 5-6 does not involve an inventive step because D1 intends to treat cancer in which CD40 expressing B cells are involved (Article 33(3) PCT).

D2 discloses also five human anti-CD40 antibodies, which have an antagonist effect. Said antibodies are disclosed by their sequences (page 3). The proposed use is the treatment of autoimmune diseases, in particular SLE (page 2, line 26); treatment of transplant reactions (page 10, line 16); inhibition of growth of tumor cells (page 10, line 17,) in particular B cell lymphoma (page 13, line 20). D2 shows in figure 1, that several of the human anti-CD40 antibodies are inhibiting the growth of normal B cells, which are stimulated by CD40L (see figure 1). Therefore D2 anticipates the subject-matter of claim 1.

D3 discloses also several human anti-CD40 antibodies, which have an antagonist effect (example 14) .

5. Dependent claim 2 is further limited to the specific monoclonal antibody Chir-12.12, produced by the hybridoma cell line PTA-5543. Said antibody is new (Article 33(2) PCT). Said precise antibody has a very high antitumoral activity as shown in the staged nude mouse xenograft model using Daudi cells. Therefore an inventive step (Article 33(3) PCT) could be acknowledged for said antibody. The present claim 2 is however also directed to a monoclonal antibody, which competes with Chir-12.12 in a competitive binding assay. The data on page 106, last line show that the antibody Chir-5.9, which does not have the high anti-tumoral activity, competes with Chir-12.12 for binding to CD40. As the antibody Chir-5.9 is only a further human antibody which has an antagonist activity on CD40 and which does not have any other surprising features, an inventive step can not be acknowledged for the antibody Chir-5.9 and as a consequence also not for section g) of claim 2 (Article 33(3) PCT) and for claims 7-9, 10, 11. Claim 45 is directed to a pharmaceutical composition comprising monoclonal antibody Chir-5.9. As the human monoclonal antibodies of D1 and D2 are intended for medical use, the subject-matter of independent claim 45 also lacks an inventive step. Dependent claims 46-54 refer to features commonly present in pharmaceutical compositions and thus do not confer an inventive step on the composition (Article 33(3) PCT).

Independent claims 12,15,18,21,25,29,41 are directed to methods for inhibiting growth of normal or tumor B cells expressing CD40, for treating autoimmune diseases and for inhibiting the CD40-mediated pathway. All these methods use also antibody Chir-5.9, which is novel but does not involve an inventive step (see above). As both D1 and D2 have disclosed the use of human antibodies, which are antagonists of anti-CD40 and which inhibit the growth of normal and malignant B cells (treatment of B cell cancer), which are useful in the treatment of autoimmune diseases and which as antagonists, inherently inhibit the CD40-CD40L mediated pathway, the subject-matter of independent claims 12,15,18,21,25,29,41 does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT). The additional features of the respective dependent claims 13,14,16,17,19,20,23,24, 26-28,30,31,42-44 do not confer an inventive step on the methods.

6. Claim 32 is directed to a method for identifying antibodies having antagonist activities by performing a competitive binding assay against Chir-5.9 or Chir-12.12. Said method is novel, but as Chir-5.9 (see section 5) does not involve an inventive step and as the use of competitive binding assays for detecting antibodies having similar properties as the competing partner is a standard procedure, the subject-matter of claim 32 does not involve an inventive step.

Claim 33 is directed to an antagonist antibody, which specifically binds to domain 2 of CD40. Data of the present application show that Chir-5.9 binds also to domain 2 of CD40 and Chir-5.9 (only a further antagonist) does not show any surprising feature. D4 (figures 1 and 3) shows that a single chain antibody F33, which also has an antagonist activity binds to domain 2 and states that the region of CD40 involved in CD40-CD40L binding is located in the D2 and D3 domain. Therefore the fact per se that the antibody binds to the known domain 2 of CD40 does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT). The subject-matter of claims 34-38, 40 all dependent on claim 33, does not involve in inventive step because it comprises the non-inventive antibody Chir-5.9 (see section 5 above). In the case of claim 40, Chir-5.9 was shown to compete with Chir12.12 and falls within the scope of section e).

The characterisation of the respective epitopes of CD40, to which the antibodies Chir-5.9 and Chir-12.12 are binding (tables 17 and 18) show that the epitope to which the non-inventive antibody Chir-5.9 (see above) binds, comprises positions 82-87. Therefore the subject-matter of claim 39 does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT).

Further Remarks:

7. The claims are not clear (Article 6 PCT) because the internal denomination CHIR-12.12 is not a generally recognised name.

ANTICUERPOS ANTAGONISTAS ANTI-CD40 MONOCLONALES Y MÉTODOS PARA SU USO

CAMPO DE LA INVENCIÓN

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 INVENCIÓN

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

198

no se expresa sobre las células T humanas de descanso, sobre reguladas sobre la superficie de célula T. La unión del ligando CD409 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 linfocitica crónica y enfermedad de Hodgkin expresa CD40. La expresión de CD40 también se detecta en dos tercios de los casos de leucemia mieloblásticas 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

(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-estimulatorio 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 eosinofilos, las membranas sinoviales en artritis reumatoide los fibroblastos dérmicos, y otros tipos de célula no linfoide. 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 INVENCIÓN

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

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

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.

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, m{as 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

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 epítopo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 12.12; un anticuerpo monoclonal que se une a un 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; 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

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

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 efectuadoras 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

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 estables 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 estables 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.:

11) para la isoforma larga del CD40 humano (secuencia ce 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 INVENCIÓN

"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.

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).

Los dominios constantes no se involucran directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, sino que exhiben varias funciones efectuadoras, 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) *Secuences 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

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 papaína 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, está 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

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

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 efectuadoras. 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

216

completamente, inhiba, o neutralice una actividad biológica de un objetivo nativo descrito aquí o trascripción 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 efectuadoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y desarrollan funciones efectuadoras. Preferiblemente, las células expresan al menos FcγRIII y llevan a cabo función efectuadora 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, eosinofilos, y neutrofilos, 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.

Los términos "receptor Fc" o "FcR" son utilizados para describir un receptor que se une a la región Fc ce 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

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

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 Vκ, segmentos Jκ, y genes Cκ. Los anticuerpos producidos en estos ratones se asemejan cercanamente a aquellos vistos en los humanos en todos los aspectos incluyendo la redisposición 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 redisposición 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

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

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 de 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

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.

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 yDaudi. Las modalidades preferidas ensayan actividad antitumoral en un modelo de etapas de tumor de xeroijerto 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 mima dosis mg sea administrada sobre una base por peso. Así, cuando el anticuerpo

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 505 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 está 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

SEC No.: 3; (4) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal producido mediante la línea celular de hibridoma 12.12; (5) un anticuerpo monoclonal que se una a un 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; (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

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 estables 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

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^{-9} 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

10^{-5} M, al menos $3x10^{-5}$ 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 trascripto 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 GenBack 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 GenBack No. NP_690593),

codificado por la ID de SEC No.: 9 (Acceso GenBack 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 trascripto (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 epítopo 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.

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

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,

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, $F(ab')_2$, F_v, 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 epítopo 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

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

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

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, $F(ab')_2$, F_v, 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 (epítopos), 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

240

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 epítopos 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, "epítopos no lineales"; aquellos epítopos 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

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 palto 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 cono una fuente preferida de tal ADN. Un

vez aislado, el ADN puede se 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,

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 "epítopo 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 epítopos de antígeno CD40 pueden comprender proteínas, fragmentos de proteína, péptidos,

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 especien 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 utilizan 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 hipervarible de especies no humanas (anticuerpo donados) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene cualquier especificidad, afinidad y capacidad deseadas. La

246

frase "región determinante de complementariedad" se refiere a una se c de aminoácido que define junto la afinidad de unión y las 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 efectuadotas. 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 elicitan 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 el 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;

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 human 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 xenogenéricos 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

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

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 está 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 compuesto referencia. De manera general, el polipéptido Fv comprende además un ligador de polipéptido entre los dominio 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. Rosenburg 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:

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

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

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 epítopos 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 epítopo de interés se pueden identificar al seleccionar una serie de anticuerpos preparados contra una proteína o fragmento CD40 de la proteína que comprende el epítopo 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 GenBack 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 GenBack 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

de marcas. La detección de la formación de un complejo de anticuerpo antígeno entre un anticuerpo anti-CD40 y un epítopo 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-galactaosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes incluyen umbeliferona, fluorescina, fluorescin 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 aecuarina; y ejemplos de materiales radioactivos adecuados incluyen ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S, o ^{3}H. 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

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

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

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 antracin diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicin D, dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaina, tetracaina, lidocaina, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de estos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no está limitados a, antimetabolitos (por ejemplo metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilatantes (por ejemplo mechloretamina, 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 gentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la porción de deroga puede ser una proteína o un polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales

260

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, linfocina, 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 Delivry" 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 *Monoconal 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.

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

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) *Pro. 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 Secuence 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⇔Ala, Val⇔Ile⇔Leu, Asp⇔Glu, Lys⇔Argg, Asn⇔Gln, y Phe⇔TRp⇔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

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 mARN 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 efectuadota 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 describes 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

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

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

(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 une 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.

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) originas 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

269

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 ce 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 monocéitica; 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.

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 graso 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 está 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.

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-galactaosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluorescina, fluorescin isotiocianato,

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 ^{3}H.

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

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 esplenectomia, hepatectomia, linfadenectomia, leucoforesis, transplante de médula ósea, y similares); terapia de radiación, quimioterapia opcionalmente en combinación con transplante de médula ósea autóloga, donde los agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no están limitados a, fludarabina o fosfato de fluderabina, 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

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 CD"0 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 hematopoieticos); 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 dolatatina; 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

pequeña de agentes de histona acetilasas (por ejemplo citodiferenciación híbrido/polar HPC) tal como ácido suberanilohidroxámico (SAHA), y FR-901228) y agentes apoptópicos 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®, Personalizad Immunoterapy, 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

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 autologa, en donde el anticuerpo y los agentes quimioterapéuticos se pueden administrar secuencialmente, o en cualquier orden, o simultáneamente (es decir, concurrentemente

280

dentro de la misma estructura de tiempo). Ejemplos de agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero no están limitados a, fludaravina o fludaravina fosfato, clorambuzil, vientrisina, 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

-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 alquilatante 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, doxorubisina mas prebnisol) y CHOP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona mas doxorubisina), 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 regímen 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 dicetilasas (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

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 efectuadoras 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 efectuadotas 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 deshonres auto inmune y/o inflamatorios. Sin ser limitantes, los ejemplos incluyen terapia de combinación triple

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

intraperitonialmente. 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

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 influencian 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 mono 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.

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

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,

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.

246

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

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

"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 diagnosis 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 arabitol. 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 $(O- CH_2 CH_2)_n$ O-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 hidroxi, más preferiblemente este es un grupo hidroxiterminal. Es ste grupo grupo hidroxi 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 polioxietilados solubles en agua son también útiles en la presente invención. Ellos incluyen sorbitol polioxietilado, glucosa polioxietilada, glicerol polioxietilado (POG), y similares. El POG es el preferido. Una razón es porque la estructura del glicerol polioxietilado 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

302

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 definas aquí anteriormente, que incluyen, pero no está 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 (sCD401); inhibición de señales intracelulares anti-apoptósicas "supervivencia" en cualquier célula estimulada por sCD401 o CD40L de fase sólida; inhibición de producción de señal CD40 en cualquier célula luego del ligamiento con sCD401 o CD40L de fase sólida; una inhibición de proliferación de células B malignas humanas como se anota en cualquier parte aquí.

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 nuevo 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 disperzamiento 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

304

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 desorpción 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)

305

Pediart. Trasnsplant. 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 ≤ 20° C, y luego descongelada a temperatura ambiente de cuarto para formulación adicional. La formulación farmacéutica

306

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/m, 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

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 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 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.

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.

309

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,

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

312

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 isotoniozante. 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

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 succionato 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

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 sufartantes 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 tácica de los farmacéuticos por tensoactivos o

315

emulsicantes como se describe, como por ejemplo, en Levine *et al (1991) J. Parenteral Sci. Techno.* 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 succionato des 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

316

pH 5.0 a aproximadamente pH 6.0, o aproximadamente pH 5.5 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 una 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 succionato 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 tesoactivo, 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

liofilizar para prevenir degradación. Los métodos para liofilizar 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 linfócitica 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 autologa; donde los agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero no están limitados a , fluradabina o fludarabina fosfato, clorambusil, vinscristina, 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

320

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 blando 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 ematopoyético); terapia de cáncer basada en molécula pequeña, que incluye, pero no esta limitado a, microtúbulo 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 galio), Thalomida (talidomina), derivados inmunomodulatorios de talidomina (por ejemplo, revlimid (anteriormente revimid), 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 dicetilasas (por ejemplo, citodiferenciación hibrido/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 blando 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

inmunoterapia 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; 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

327

-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

328

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

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 transplante de medula 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.

330

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 adelantes 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 IgG_1 humano (mAbs) generado por inmunización de ratones transgénicos que llevan el locus de cadena pesada IgG_1 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 $1.2x10^{-8}$ M y la afinidad de unión del CHIR-12.12 al CD40 humano es $5x10^{-10}$ M.

331

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 Cultura 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 Inmuglobilina

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 Suorce 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

(Caltaq, 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

333

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

334

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

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 incubar con la columna a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se 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 de cuentan y se centrifugan una vez más. Se remueve el súper nadante, 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 (Caltaq) 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).

336

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 polietilentiglicol 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 (Genzyma, 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

338

	Título anti CD40				
# de fusión	(1:100K)	Eficiencia de fusión	# de células seleccionadas	# de ELISA*	# de célula de Superficie*
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	1.76	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 superficie 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	+++	+++	++	-	12067	SI
	131.2F5.8.5.11	+++	+++	++	-	12065	SI
	153.3C5D6D7.8.4.7.1	++	ND	ND	ND	ND	
153.3C5	153.3C5D6D7.8.4.7.8	++	ND	ND	ND	ND	
	153.3C5D6D7.8.4.7.11	+++	+++	+	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
	155.2C2B9F12.2.10.4	+++	+/-	ND	ND	12064	
155.2C2	155.2C2B9F12.2.10.5	+++	ND	ND	ND	12065	
	155.2C2B9F12.2.10.6	+/-	ND	ND	ND	12066	
	166.5B6G12.1	+++	ND	ND	ND	12069	
166.5B6	166.5B6G12.3	+++	ND	ND	ND	12070	
	166.5B6G12.4	+++	+	ND	ND	12071	
177.3C10	177.3C10B3H9	+++	++	ND	ND	ND	
	183.4B3B11.6.1.5	++	ND	ND	ND	ND	
183.4B3	183.4B3B11.6.1.9	++	ND	ND	ND	ND	
	183.4B3B11.6.1.10	+++	++	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	
	184.6C11D9.2	++	ND	ND	ND	12078	
184.6C11	184.6C11D5.3	++	ND	ND	ND	12080	
	184.6C11D3.6	+/-	+/-	ND	ND	12079	
	185.3B4F12.5.6	+++	ND	ND	ND	12072	
185.3B4	185.3B4F12.5.11	+++	ND	ND	ND	12073	
	185.3B4F12.5.12	+++	+	ND	ND	12074	
	185.1A9B9.6.1	+	ND	ND	ND	ND	
185.1A9	185.1A9B9.6.6	+++	+++	+	ND	ND	
	185.9F11B10.3B5.1	+++	ND	ND	ND	ND	
185.9F11	185.9F11B10.3B5.8	+++	ND	ND	ND	ND	
	185.9F11B10.3B5.12	+++	+++	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).

340

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

341

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 Epítopos 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 IgG_2 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 bloqueela 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 $hIgG_1$ 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 NaCI, 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.

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.

345

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.

346

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. (ng/ml)	huIgG1		CHIR-5.9	
						CPM	% de Inhibición	CPM	% de Inhibición
PBMC-010		1851	121	4436	1	5060	-26	2822	74
		1851	121	4436	0.25	6466	-43	2907	62
		1851	121	4436	0.0625	6029	-56	2819	74
		1851	121	4436	0.0156	5814	-56	1789	131
PBMC-011	Donador # 1	2162	178	8222	10	13137	-84	2282	101
		2162	178	8222	1	11786	-61	1436	115
		2162	178	8222	0.1	10758	-43	1249	119
		2162	178	8222	0.01	11322	-63	4705	60
	Donador # 2	2218	294	7873	10	16979	-164	2362	103
		2218	294	7873	1	14146	-117	1202	124
		2218	294	7873	0.1	12422	-85	786	133
		2218	294	7873	0.01	13670	-112	6909	24
	Donador # 3	2366	241	11021	10	11841	-7	2631	100
		2366	241	11021	1	13826	-30	1480	114
		2366	241	11021	0.1	12176	-14	990	120
		2366	241	11021	0.01	11895	-10	6957	68
	Donador # 4	4562	133	15301	10	22006	-84	3766	109
		4562	133	15301	1	19446	-39	2040	126
		4562	133	15301	0.1	18306	-22	1726	128
		4562	133	15301	0.01	23797	-70	9481	55
PBMC-012		777	117	6041	10	7327	-28	2160	76
		777	117	6041	1	6212	-3	1550	87
		777	117	6041	0.1	7006	-19	928	101
		777	117	6041	0.01	7524	-29	1213	94
PBMC-014		1957	73	7869	100	9369	-25	3379	76
		1957	73	7869	20	8120	-4	3870	67
		1957	73	7869	4	8306	-8	2552	90
		1957	73	7869	0.8	9964	-26	1725	103
PBMC-015	Donador # 1	3203	127	10466	100	16429	-69	1497	126
		3203	127	10466	20	11467	-14	1611	124
		3203	127	10466	4	11841	-16	1559	126
		3203	127	10466	0.8	12807	-32	1490	126
	Donador # 2	3660	175	15145	100	21432	-56	1792	118
		3660	175	15145	20	16956	-16	1779	118
		3660	175	15145	4	17729	-23	1965	117
		3660	175	15145	0.8	17346	-19	2217	115
	Donador # 3	2734	152	19775	100	22937	-19	1964	107
		2734	152	19775	20	21224	-9	1948	108
		2734	152	19775	4	20858	-5	1934	108
		2734	152	19775	0.8	18823	5	1262	110
PBMC-016		1118	36	13631	0.1	10828	21	745	103
		1118	36	13631	0.05	11467	17	982	102
		1118	36	13631	0.01	11852	13	3013	85
PBMC-017		982	76	12910	1	13697	-9	256	107

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-(CPM con Abs-PBMC solo-CHO-CD40L solo)/(CPM de PBMC+CHO-CD40L-PBMC solo-CHO-CD40L solo)*100%

348

Tabla 4B. Efecto de CHIR-12.12 mAB sobre proliferación PBMC inducida por CD40L

Expt		solo PBMC	sólo CHO-CD40L	PBMC+ CHO-CD40L	Conc. Abs. (µg/ml)	HuIgG1 CPM	HuIgG1 % de inhibición	CHIR-12.12 CPM	CHIR-12.12 % de inhibición	IC50(µg/ml)
PBMC-025	Donador # 1	4691	52	42692	0.1	33364	23	446	110	
		4691	22	42292	0.01	37139	14	8888	89	
		4691	33	42292	0.001	40871	5	33878	26	
		4691	22	42292	0.0001	40554	5	37261	13	24.22
	Donador # 2	2260	31	14997	0.1	15767	-8	365	118	
		2260	31	14997	0.01	17634	-17	6734	66	
		2260	31	14997	0.001	20142	-41	16163	-9	
		2260	31	14997	0.0001	17647	-23	16187	-9	65.96
PBMC-026	Donador # 1	2988	35	19971	0.1	17126	11	624	109	
		2988	35	19971	0.01	16445	15	6458	74	
		2988	35	19971	0.001	16185	17	17833	7	
		2988	35	19971	0.0001	18286	8	17834	7	45
	Donador # 2	2918	84	17934	0.1	17161	4	2078	109	
		2918	84	17934	0.01	16757	7	10948	44	
		2918	84	17934	0.001	18913	-5	17934	-1	
		2918	84	17934	0.0001	17169	4	18588	-5	84
PBMC-028	Donador # 1	4288	45	22947	1	16304	24	2888	112	
		4288	45	22947	0.1	20879	10	1827	114	
		4288	45	22947	0.01	22799	-1	6520	86	
		4288	45	22947	0.001	23647	-5	22827	1	
		4288	45	22947	0.0001	25775	-12	26134	-9	30.07
	Donador # 2	2148	86	84884	1	48945	12	6199	94	
		2148	86	84884	0.1	49795	17	8091	96	
		2148	86	84884	0.01	81741	6	18880	68	
		2148	86	84884	0.001	89421	5	80878	7	
		2148	86	84884	0.0001	84778	0	82881	4	34.68
PBMC-029	Donador # 1	800	69	18884	0.1	11887	-10	2088	85	
		800	69	18884	0.01	10887	0	1827	88	
		800	69	18884	0.001	10222	-2	6520	38	
		800	69	18884	0.0001	11287	-13	22827	-131	28.08
	Donador # 2	7737	87	23432	0.1	21884	12	3538	134	
		7737	87	29432	0.01	21729	9	10248	84	
		7737	87	29132	0.001	22879	4	20380	-2	
		7737	87	29132	0.0001	20491	4	22182	0	88.35
PBMC-030	Donador # 1	2739	47	53439	0.1	60116	-13	2132	101	
		2739	47	53439	0.01	58911	-8	14257	77	
		2739	47	53439	0.001	59157	-11	62889	-5	
		2739	47	53439	0.0001	60290	-12	60999	-16	35.62
		4310	80	53791	0.1	52851	2	3209	102	
	Donador # 2	4310	80	53791	0.01	51741	4	30719	47	
		4310	80	53791	0.001	53072	1	53529	0	
		4310	80	53791	0.0001	53945	-0	54243	-1	102.89
PBMC-032	Donador # 1	3456	42	14056	0.1	16579	-22	538	116	40.38
		3456	42	14056	0.01	16250	-45	3309	83	
		3456	42	14056	0.001	19552	-50	20039	-57	
		3456	42	14056	0.0001	19161	-44	16907	-42	

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

350

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	439	103	371	109	152	114
		418	89	3132	20	3199	-2	346	107	222	111
		418	89	3132	4	3175	-2	144	114	235	110
		418	89	3132	0.8	6334	-122	265	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	287	75	24552	1	25910	-6	291	100	102	101
		287	75	24552	0.1	28447	-16	259	100	108	101
		287	75	24552	0.01	26706	-9	2857	89	4922	81
Promedio de % de inhibición							-8		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

351

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+huIgG1		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	496	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 008	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	908	3.40	2203	8.25	1027	3.85
		267	24552		0.001	567	2.13	846	3.17	826	3.09
Promedio de Índice de Estimulación (SI) 145.25							1.39		5.08		2.89

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#		PBMC	PBMC+CHO-CD40L		Cons. Abs. (ug/ml)	PBMC+huIgG1		PBMC+CHIR-5.9	
			CPM	Índice (1)		CPM	Índice (2)	CPM	Índice (2)
PBMC-010		1417	6279	3.79	1	1218	0.86	597 3	4.22
		1417	5279		0.25	1712	1.21	491 5	3.49
		1417	5279		0.062 5	1449	1.02	394 2	2.57
		1417	5279		0.015 6	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	2374	1159 1	4.87	10	4866	2.05	462 3	1.91
		2374	1159 1		1	2544	1.07	244 5	1.03
		2374	1159 1		0.1	2177	0.92	148 2	0.62
		2374	1159 1		0.01	4672	1.97	189 8	0.80
	Donador #3	3229	7958	2.46	10	5035	1.56	211 9	0.65
		3229	7958		1	2826	0.88	109 9	0.34
		3229	7958		0.1	2277	0.71	105 2	0.33
		3229	7958		0.01	3078	0.95	189 9	0.59
	Donador #4	4196	1431 4	3.41	10	5012	1.19	517 6	1.23
		4196	1431 4		1	3592	0.86	470 2	1.12
		4196	1431 4		0.1	5286	1.26	431 9	1.03
		4196	1431 4		0.01	5758	1.37	540 9	1.29
PBMC-014		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	2326	0.99	167 1	0.71
PBMC-015	Donador #1	3284	1293 6	3.94	100	3586	1.10	186 2	0.91
		3284	1293 6		20	2751	0.84	156 2	0.48
		3284	1293 6		4	3135	0.95	110 5	0.34
		3284	1293 6		0.8	4027	1.23	141 9	0.43
	Donador #2	6099	1912 1	3.14	100	2969	0.49	510 4	0.84

		1912					391	
	6089	1		20	4025	0.88	7	0.64
		1912					334	
	6089	1		4	4496	0.74	1	0.59
		1912					413	
	6089	1		0.8	3934	0.83	9	0.68
Donador #3		1982					120	
	2479	6	8.00	100	3584	1.44	4	0.49
		1982						
	2479	6		20	1874	0.76	782	0.32
		1982						
	2479	6		4	1779	0.72	694	0.28
		1982						
	2479	6		0.8	2274	0.92	997	0.38
PBMC-016		1578					103	
	1148	9	12.75	0.1	1285	1.99	6	0.90
		1578						
	1148	9		0.05	1284	1.12	871	0.76
		1578						
	1148	9		0.01	1446	1.26	932	0.83
Promedio SI de PBMC			8.08			1.06		1.03

indice(1): =(PBMC+CHO-CD40L)/PBMC

indice(2): =(PBMC+Abs)/PBMC

355

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

Exp#		PBMC	PBMC+CHO-CD40L CPM	Indice (1)	Conc. Abs (µg/ml)	PBMC+IgG1 CPM	Indice (2)	PBMC+CHIR-12.12 CPM	Indice (2)
PBMC-025	Donador #1	4051	42292	10.44	0.1	2909	0.72	2451	0.61
		4051	42292		0.01	4725	1.17	8824	2.20
		4051	42292		0.001	8080	1.99	8782	2.17
		4051	42292		0.0001	4391	1.07	4342	1.07
	Donador #2	2260	14957	6.65	0.1	2536	1.12	6141	2.66
		2260	14957		0.01	3624	1.66	8021	3.66
		2260	14957		0.001	3169	1.40	4464	1.98
		2260	14957		0.0001	2901	1.34	2533	1.12
PBMC-026	Donador #1	2085	18313	8.78	0.1	1385	0.66	2761	1.32
		2085	18313		0.01	2671	1.28	3182	1.52
		2085	18313		0.001	2602	1.25	3239	1.55
		2085	18313		0.0001	1709	0.82	1766	0.85
	Donador #2	676	18054	26.71	0.1	669	0.99	2229	3.30
		676	18054		0.01	2884	4.34	1238	1.83
		676	18054		0.001	993	1.49	1537	2.33
		676	18054		0.0001	964	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	3218	1.17	3501	1.28
		2742	13028		0.0001	5107	1.86	4272	1.56
	Donador #2	1336	11901	8.89	0.1	1633	1.22	1943	1.45
		1336	11901		0.01	1520	1.14	5132	3.84
		1336	11901		0.001	1617	1.19	2057	1.54
		1336	11901		0.0001	1047	0.78	2076	1.55
PBMC-028	Donador #1	4288	22617	5.28	0.1	3686	0.86	2625	0.59
		4288	22617		0.01	3113	0.73	2047	0.48

356

		4386	22847		0.001	4414	1.00	3515	0.80
		4386	22847		0.0001	2452	0.57	4159	0.95
	Donador #2	2148	54894	26.56	0.1	9127	4.25	6574	3.06
		2148	54894		0.01	4666	2.13	6515	3.03
		2148	54894		0.001	5885	2.48	6919	2.76
		2148	54894		0.0001	4667	2.17	4286	2.00
PBMC-089	Donador #1	609	10054	16.51	0.1	359	0.59	393	0.65
		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	958	0.92
	Donador #2	7737	23132	2.99	0.1	4940	0.64	3498	0.45
		7737	23132		0.01	6941	0.78	3644	0.47
		7737	23132		0.001	5668	0.66	5222	0.68
		7737	23132		0.0001	6138	0.66	6941	0.90
PBMC-090	Donador #1	4184	57205	13.74	10	2713	0.65	1948	0.35
		4184	57205		1	3627	0.87	1576	0.38
		4184	57205		0.1	4699	1.10	1512	0.36
		4184	57205		0.01	4184	1.00	2711	0.65
	Donador #2	3324	53855	16.20	10	6374	1.92	4731	1.42
		3324	53855		1	4729	1.42	5219	1.57
		3324	53855		0.1	3888	1.17	5869	1.77
		3324	53855		0.01	3863	1.16	5857	1.70
PBMC-092	Donador #1	1808	15271	8.46	10	2349	1.30	4760	2.65
		1808	15271		1	3829	2.11	5209	2.88
		1808	15271		0.1	2096	1.16	6382	3.53
		1808	15271		0.01	1799	0.99	5005	2.77
Promedio SI de PBMC				11.92			1.39		1.52

índic

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.

357

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

	PBMC	PBMC+CHO-CD40L			PBMC+IgG1		PBMC+CHIR-5.9		PBMC+CHIR-12.12	
Expt	CPM	CPM	Índice S (1)	(ng/ml)	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 muestras 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.

359

mAB anti-CD40 dependiente de muerte de líneas celulares de linfoma por ADCC

Equip	Célula efectora	Proporción E:T	Células objetivo: líneas de célula de linfoma humano (Ramos o Daudi)							
			IgG1	Conc. Ab. (µg/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	17.06	5	30.76	13.70	68.22	46.17	ND	ND
Alamar Blue	huNK	3	40.81	5	68.62	17.81	87.87	47.06	ND	ND
ADCC-006	huNK	2	-8.09	10	3.50	6.69	43.71	48.8	34.82	37.91
Alamar Blue			-8.62	1	-30.10	-1.48	46.13	53.75	37.07	46.69
			-11	0.1	-14.80	-3.69	32.82	66.62	33.61	44.61
			-4.84	0.01	2.53	7.37	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	37.68	35.181	ND	ND
ADCC-009	huNK	10	2.52	5	68.30	65.86	97.70	95.38	69.2	66.68
Calcein AM			0.46	1	67.20	66.72	123.00	122.62	69.2	67.72
			-1.45	0.2	76.40	76.83	118.00	119.45	69.8	69.23
			3.39	0.04	66.10	62.71	109.00	105.61	64.9	61.61
ADCC-011	huNK	9	3.18	1	15.36	12.19	51.60	48.42	22.44	19.27
Calcein AM			4.56	0.01	7.29	2.81	46.80	42.22	14.69	10.19
			5.41	0.002	0.95	0.94	5.10	-0.31	0.56	4.16
			7.03	0.0004	7.76	0.73	5.99	-1.04	5.99	-1.04
ADCC-012	huNK	10	19.34	10	73.51	60.57	117.80	104.46	50.75	37.41
Calcein AM			19.60	1	74.76	61.26	90.04	76.14	65.97	52.47
			12.27	0.01	66.62	46.95	72.98	60.61	60.16	37.99
			13.61	0.005	67.50	43.89	60.45	56.84	36.25	25.67
			11.95	0.001	66.61	44.66	65.17	60.22	33.67	21.12
ADCC-013	PBMC	100	2.64	1	21.09	18.45	37.94	35.40	32.26	29.74
51Cr			2.46	0.1	18.60	15.05	30.62	28.37	27.16	24.78
			2.92	0.01	14.69	11.91	22.59	19.87	12.79	9.97
			2.78	0.001	3.00	1.12	8.99	6.21	3.13	0.35
ADCC-014	PBMC	100	4.64	10	53.54	43.99	56.12	51.48	ND	ND
51Cr			4.64	1	46.54	42.36	49.00	36.36	ND	ND
			4.64	0.1	45.63	40.99	39.94	34.36	ND	ND
			4.64	0.01	7.75	3.66	8.79	6.18	ND	ND
			4.64	0.001	8.65	4.99	10.61	8.17	ND	ND
Promedio de % de lisis a 1 µg/ml de concentración de mAb						38.31		50.85		47.23

El grado mayor de corte 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

360

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-hIgG_2-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*

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 cancerigenas 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.

362

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					CPM	
		Células + IgG	Célula + CHIR-5.9	CHIR-5.9	Células CPM+ CHR 12.12	CHIR-12.12	Células + M881	M881
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

363

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 ^{3}H-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.

		CPM	CHIR-5.9		CHIR-12.12		Rituximab	
Paciente	(ug/ml)	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-(CPM con ensayo Abs/CPM con control mAb)*100%

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.

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 0	1000000	0.00
	7	935000	447500	52.14
	10	127090 0	504100	60.34
	14	102910 0	525000	48.98
MT	0	100000 0	1000000	0.00
	7	267600	182500	31.80
	10	683400	191600	71.96
	14	145000 0	225000	84.48
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

366

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 IgG_1 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

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

Paciente #	Conc. Abc. (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	269.31	25.27	ND	90.62	ND
	10	101.58	33.07	ND	67.44	ND
	100	130.71	40.16	ND	69.28	ND
2	1	265.55	75.8	ND	71.46	ND
	10	227.57	128.5	ND	43.53	ND
	100	265.99	6.4	ND	97.59	ND
3	1	85.9	35.39	ND	58.80	ND
	10	70.44	39.51	ND	43.91	ND
	100	77.65	20.95	ND	73.02	ND
4	1	80.48	15.03	ND	81.32	ND
	10	63.01	19.51	ND	69.04	ND
	100	55.69	3.65	ND	93.45	ND
5	1	90.63	91.66	89.59	-1.14	1.15
	10	78.13	82.28	60.41	-5.31	22.68
	100	63.53	86.47	39.59	-36.11	37.68
6	1	130.21	77.6	71.88	40.40	44.89
	10	131.77	78.13	73.96	40.71	43.87
	100	127.08	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

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

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®.

Modelos de linfoma de célula B humana de xenoingerto

341

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 mm^3 (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 mm^3, 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-Wallist 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 rituxamab, 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 le 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, en 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

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 Epítopo para Anticuerpos Monoclonales para CHIR-12.12 y CHIR-5.9

Para determinar la ubicación del epítopo 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® 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

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 epítopo 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 epítopo 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 epítopo.

El anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 reconoce un epítopo 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

375

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 epítopo 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 péctidos se muestra en la Tabla 17.

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

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.

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 epítopos 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 epítopo 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 epítopo 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).

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 x (ensayo AFU - liberación espontánea de AFU)/(liberación máxima de AFU - 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.

	Muerte máxima (%)		ED50 (pM)	
Célula de donador NK	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-apoputóticas, XIAP y Mcl-1, en células B normales. La estimulación CD40 mediada por CD40L también recupera el TRAF2 y TRAF3 para unirse al dominico 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 quinaza IκB (IKK) α y β (trayectoria NFκB), 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 x 10^6 células B humanas normales de donantes saludables (porcentaje de pureza entre 85-95%) se estimulan con 1 µg/ml de sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). El CHIR-12.12 (10 µg/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

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 incremente 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 x 10^6 células B humanas normales de donantes saludables (porcentaje de pureza entre 85-95%) se estimulan con 1 µg/ml de sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). Se agregan CHIR-12.12 (10 µg/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

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 IKKα (Ser 180) y IKKβ (ser 181) en células B normales.

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

En resumen, la estimulación por sCD40L resulta en la fosforilación de IKKα (Ser 180) y IKKβ (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.

En estos experimentos, 0.6 x 10^6 células B humanas normales de donantes saludables (porcentaje de pureza entre 85-95%) se estimulan con 1 µg/ml de sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). Se agrega CHIR-12.12 (0.01, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 µg/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 x 10^6 células B humanas normales de donantes saludables (porcentaje de pureza entre 85-95%) se estimulan con 1 µg/ml de sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). El CHIR-12.12 (0.5, 2, y 10 µg/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 x 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.

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

En estos experimentos, 1.0 x 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 µg/ml de sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). Los cultivos se tratan con CHIR-12.12 (10 µg/ml) e IgG de control. Las células se recolectan en 0 y 20 minutos. El fosfo-IKKα, fosfo-IKKβ, IKKβ 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 IKKα/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.

En estos experimentos, 1.0 x 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 x 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 inmunopresipita

utilizando anti-CD40 poliglonal (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 abroga 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

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.

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 especimenes 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 construidos por ingeniería para interrumpir la unión Fc a aquellos receptores bloquearan la inhibición de crecimiento de tumor mediada por

ADCC. La perdida 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

392

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 ≤ - 60° 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.

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

393

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 teñido azul Coomassie.

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 socio, 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, Tm, 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).

396

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.

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 acídicas eluídas antes que las especies de pico principal, y las variantes de adición de lysina 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 acídicas en el pH de la solución. Las muestras de control ya contienen un alto grado de especies acídicas (~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 acídicas que el control. El porcentaje de especies acídicas 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 acídicas				
	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), Macroglolubilemia 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

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 descontinuar 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

401

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

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.

403

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	Solo para uso de la Oficina Internacional
☑ Está hoja se recibe con la solicitud internacional	☐ Está hoja se recibe con la Oficina Internacional en:
Funcionado autorizado (Firma ilegible)	Funcionado autorizado

404

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	Solo para uso de la Oficina Internacional
☑ Está hoja se recibe con la solicitud internacional	☐ Está hoja se recibe con la Oficina Internacional en:
Funcionado autorizado (Firma ilegible)	Funcionado autorizado

405

ATCC

1081 University Bulevar · 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 La 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 parsona 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

406

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humano que es capaz de unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expresado sobre la superficie de una célula que expresa el CD40 humano, dicho anticuerpo monoclonal está libre de actividad agonista significativa, en donde dicho anticuerpo monoclonal exhibe incremento de actividad antitumor relacionada con una cantidad equivalente del anticuerpo monoclonal anti-CD40 quimérico monoclonal IDEC-C2B8, en donde dicha actividad de tumor se ensaya en un modelo de tumor xenoinjerto de ratón desnudo representado utilizando la línea de célula de linfoma de célula B humano Daudi.

2. El anticuerpo monoclonal humano de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo se selecciona a partir del grupo que consiste de:

a) anticuerpo monoclonal CHIR-12.12;

b) anticuerpo monoclonal producido por la línea de célula de hibridoma 12.12, depositado con el ATCC como Depósito de Patente No. PTA-5543;

c) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácido 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.: 1, ambas las 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.: 6, e ID de SEC No.: 5;

d) un anticuerpo monoclonal que tiene 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 la secuencia mostrada en la ID de SEC No.: 1, e ID de SEC No.: 3;

e) un anticuerpo monoclonal que se une a une a un epítopo capaz de unir el anticuerpo monoclonal producido por la líneas de célula de hibridoma 12.12;

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

g) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitivo;

h) un anticuerpo monoclonal del ítem precedente a) o un anticuerpo monoclonal de una cualquiera de los ítems precedentes c)-g), en donde dicho anticuerpo se produce recombinantemente; y

i) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal de uno cualquiera de los ítems precedentes a)-h), en donde dicho fragmento retiene la capacidad de unirse específicamente a dicho antígeno CD40 humano.

3. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo monoclonal se une a dicho antígeno CD40 humano con una afinidad (K_D) de al menos aproximadamente 10^{-6} M a aproximadamente 10^{-12} M.

4. Una línea de célula de hibridoma capaz de producir el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1.

5. Un método para tratar un cáncer caracterizado por la expresión del CD40, que comprende administrar a un paciente humano una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-CD40 de la reivindicación 1.

6. El método de la reivindicación 5, en donde dicho cáncer se selecciona a partir del grupo que consiste de linfoma no-Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, mieloma

múltiple, linfoma de célula B, linfoma de célula B de alto grado, linfoma de célula B de grado intermedio, linfoma de ce B de grado bajo, leucemia linfoblástica aguda de célula B, leucemia mieloblástica y enfermedad de Hodgkin.

7. Un anticuerpo monoclonal humano que es capaz de unirse de unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expresado en la superficie de la célula que expresa el CD40 humano, dicho anticuerpo monoclonal está libre de actividad agonista significativa, por lo cual, cunado dicho anticuerpo monoclonal se une al anticuerpo CD40 expresado sobre la superficie de dicha célula, el que crecimiento o diferenciación de dicha célula se inhibe, en donde dicho anticuerpo se selecciona a partir del grupo que consiste de:

a) el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12;

b) el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma de la línea celular 5.9 o 12.12;

c) 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 e ID de SEC No.: 7, y ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 6, y la ID de SEC No.: 8;

d) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácido 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, e ID de SEC No.: 5;

e) 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 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, e ID de SEC No.: 3;

f) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo capaz de unir el anticuerpo monoclonal producido por la línea de célula de hibridoma 5.9 o 12.12;

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

411

h) 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;

i) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitivo;

j) el anticuerpo monoclonal del ítem precedente a) o un anticuerpo monoclonal de uno cualquiera de los ítems precedentes c)-i), en donde dicho anticuerpo se produce recombinantemente; y

k) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpc monoclonal de uno cualquiera de los ítems precedentes a)-j), en donde dicho fragmento retiene la capacidad de unirse específicamente a dicho antígeno CD40 humano.

8. El fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 7, en donde dicho fragmento se selecciona a partir del grupo que consiste de un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmentos Fv y un fragmento Fv de cadena sencilla.

9. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 7, en donde dicho anticuerpo monoclonal se une a dicho antígeno CD40

humano con una afinidad (K_D) de al menos aproximadamente 10^{-6} M a aproximadamente 10^{-12} M.

10. Una molécula de ácido nucleico aislado que comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de la secuencia mostrada en la ID de SEC No.: 2, ID de SEC No.: 4, ID de SEC No.: 5, ID de SEC No.: 6, ID de SEC No.: 7 e ID de SEC No.: 8.

11. La línea de célula de hibridoma capaz de producir un anticuerpo monoclonal humano que tiene especificidad para antígeno CD40 humano expresado en la superficie de una célula que expresa CD40 humano, por lo cual dicho anticuerpo monoclonal es libre de actividad agonista significativa, por lo cual cunado dicho anticuerpo monoclonal une el antígeno CD40 expresado en la superficie de dicha célula, el crecimiento o diferenciación de dicha célula se inhibe, y en donde dicho anticuerpo monoclonal se selecciona a partir del grupo que consiste de :

a) el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12;

b) el anticuerpo monoclonal producido por la línea de células hibridoma 5.9 o 12.12;

c) 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 e ID de SEC No.: 7, y ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 6, y la ID de SEC No.: 8;

d) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácido 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, e ID de SEC No.: 5;

e) un anticuerpo monoclonal que tiene una secuencia de aminoácido codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótido seleccionada a partir 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 la ID de SEC No.: 3;

f) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo capaz de unir el anticuerpo monoclonal producido por la línea de célula de hibridoma 5.9 o 12.12;

414

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

h) 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;

i) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitivo; y

j) un anticuerpo monoclonal que se une al fragmento de unión de antígeno de un anticuerpo monoclonal de uno cualquiera de los ítems precedentes a)-i), en donde dicho fragmento retiene la capacidad de unir específicamente a dicho antígeno CD40 humano.

12. Un método para inhibir el crecimiento o diferenciación de una célula B human normal, que comprende poner en contacto dicha célula B con una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-CD40 humano seleccionado del grupo que consiste de:

a) el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12;

415

b) el anticuerpo monoclonal producido por la líneas de célula de hibridoma 5.9 o 12.12;

c) 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 e ID de SEC No.: 7, y ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 6, e ID de SEC No.: 8;

d) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácido 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 de las secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 2, e ID de SEC No.: 5;

e) 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 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, e ID de SEC No.: 3;

f) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo capaz de unir el anticuerpo monoclonal producido por la línea de células de hibridoma 5.9 o 12.12;

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

h) 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;

i) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitivo;

j) el anticuerpo monoclonal del ítem precedente a) o un anticuerpo monoclonal de uno cualquiera de los ítems precedentes c)-i), en donde dicho anticuerpo se produce recombinantemente; y

k) un anticuerpo monoclonal que es fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal de uno cualquiera de los ítems precedentes a)-j), en donde dicho fragmento retiene la capacidad de unirse específicamente a dicho antígeno CD40 humano.

417

Dicho anticuerpo o fragmento de este está libre de actividad agonista significativa, y por lo cual cuando dicho anticuerpo o fragmento de este se une a antígeno CD40 en dicha célula B, el crecimiento o diferenciación de dicha célula B se inhibe.

13. El método de la reivindicación 12, en donde dicho anticuerpo monoclonal o fragmento de este se une a dicho antígeno CD40 humano con una afinidad (K_D) de al menos aproximadamente 10^{-6} M a aproximadamente 10^{-12} M.

14. El método de la reivindicación 12, en donde dicho fragmento se selecciona a partir del grupo que consiste de un fragmento Fab, fragmento $F(ab')_2$, un fragmentos Fv y un fragmento Fv de cadena sencilla.

15. Un método 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 poner en contacto dicha célula B con una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-CD40 humano seleccionado del grupo que cosiste de:

a) el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12;

b) el anticuerpo monoclonal producido por la línea célula de hibridoma de 5.9 o 12.12;

c) 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 e ID de SEC No.: 7, y ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 6, e ID de SEC No.: 8;

d) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácido 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 e ID de SEC No.: 4, y ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 2, e ID de SEC No.: 5;

e) un anticuerpo monoclonal que tiene una secuencia de aminoácido codificado 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, e ID de SEC No.: 3;

f) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo capaz de unir el anticuerpo monoclonal producido por la línea de célula de hibridoma 5.9 o 12.12;

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

h) 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;

i) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitivo;

j) el anticuerpo monoclonal del ítem precedente a) o un anticuerpo monoclonal de uno cualquiera de los ítems precedentes c)-i), en donde dicho anticuerpo se produce recombinantemente; y

a) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal de uno cualquiera de los ítems precedentes a)-j), en donde dicho fragmento retiene la capacidad de unirse específicamente a dicho antígeno CD40 humano.

420

Dicho anticuerpo o fragmento de este está libre de actividad agonista significativa, y por lo cual cuando dicho anticuerpo o fragmento de este se une a antígeno CD40 en dicha célula B, se inhibe el crecimiento o diferenciación de dicha célula B.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde dicho anticuerpo monoclonal se une a dicho antígeno CD40 humano con una afinidad (K_D) de al menos aproximadamente 10^{-6} M a aproximadamente 10^{-12} M.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde dicho fragmento se selecciona a partir del grupo que consiste de un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmentos Fv y un fragmento Fv de cadena sencilla.

18. Un método para inhibir la producción de anticuerpo por las células B en un paciente hamo, que comprende administrar a un paciente humano una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-CD40 humano o fragmento de este seleccionado del grupo que cosiste de:

a) el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12;

b) el anticuerpo monoclonal producido por la línea célula de hibridoma de 5.9 o 12.12;

421

c) 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 e ID de SEC No.: 7, y ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 6, e ID de SEC No.: 8;

d) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácido 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 e ID de SEC No.: 4, y ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 2, e ID de SEC No.: 5;

e) un anticuerpo monoclonal que tiene una secuencia de aminoácido codificado 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, e ID de SEC No.: 3;

422

f) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo capaz de unir el anticuerpo monoclonal producido por la línea de célula de hibridoma 5.9 o 12.12;

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

h) 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;

i) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitivo;

j) el anticuerpo monoclonal del ítem precedente a) o un anticuerpo monoclonal de uno cualquiera de los ítems precedentes c)-i), en donde dicho anticuerpo se produce recombinantemente; y

k) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal de uno cualquiera de los ítems precedentes a)-j), en donde dicho fragmento retiene la capacidad de unir específicamente a dicho antígeno CD40 humano;

Dicho anticuerpo o fragmento de este está libre de actividad agonista significativa, y por lo cual cuando dicho anticuerpo o fragmento de este se une a antígeno CD40 en dicha célula B, se inhibe el crecimiento o diferenciación de dicha célula B.

19. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde dicho anticuerpo monoclonal se une a dicho antígeno CD40 humano con una afinidad (K_D) de al menos aproximadamente 10^{-6} M a aproximadamente 10^{-12} M.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde dicho fragmento se selecciona a partir del grupo que consiste de un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmentos Fv y un fragmento Fv de cadena sencilla.

21. Un método 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 humano seleccionado del grupo que cosiste de:

a) el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12;

b) el anticuerpo monoclonal producido por la línea célula de hibridoma de 5.9 o 12.12;

c) 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 e ID de SEC No.: 7, y ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 6, e ID de SEC No.: 8;

d) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácido 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 e ID de SEC No.: 4, y ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 2, e ID de SEC No.: 5;

e) un anticuerpo monoclonal que tiene una secuencia de aminoácido codificado 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, e ID de SEC No.: 3;

f) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo capaz de unir el anticuerpo monoclonal producido por la línea de célula de hibridoma 5.9 o 12.12;

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

h) 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;

i) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitivo;

j) el anticuerpo monoclonal del ítem precedente a) o un anticuerpo monoclonal de uno cualquiera de los ítems precedentes c)-i), en donde dicho anticuerpo se produce recombinantemente; y

k) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal de uno cualquiera de los ítems precedentes a)-j), en donde dicho fragmento retiene la capacidad de unirse específicamente a dicho antígeno CD40 humano.

Dicho anticuerpo o fragmento de este está libre de actividad agonista significativa, y por lo cual cuando dicho anticuerpo o fragmento de este se une a antígeno CD40 en

a) el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12;

b) el anticuerpo monoclonal producido por la línea de célula de hibridoma de 5.9 o 12.12;

c) 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 e ID de SEC No.: 7, y ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 6, e ID de SEC No.: 8;

d) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácido 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 e ID de SEC No.: 4, y ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 2, e ID de SEC No.: 5;

e) un anticuerpo monoclonal que tiene una secuencia de aminoácido codificado 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.:

dicha célula B, se inhibe el crecimiento o diferenciación de dicha célula B.

22. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde dicho anticuerpo monoclonal se une a dicho antígeno humano CD40 con una afinidad (K_D) de al menos aproximadamente 10^{-6} M a aproximadamente 10^{-12} M.

23. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde dicho fragmento se selecciona a partir del grupo que consiste de un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmentos Fv y un fragmento Fv de cadena sencilla.

24. El método de la reivindicación 21, en donde dicho cáncer se selecciona a partir del grupo que consiste de linfoma no-Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, linfoma de célula B, linfoma de célula B de alto grado, linfoma de célula B de grado intermedio, linfoma de ce B de grado bajo, leucemia linfoblástica aguda de célula B, leucenia mieloblástica y enfermedad de Hodgkin.

25. Un método para tratar una enfermedad autoinmune, que comprende administrar a un paciente humano una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-CD40 humano seleccionado del grupo que consiste de:

3, y ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 1, e ID de SEC No.: 3;

f) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo capaz de unir el anticuerpo monoclonal producido por la línea de célula de hibridoma 5.9 o 12.12;

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

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

i) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitivo;

j) el anticuerpo monoclonal del ítem precedente a) o un anticuerpo monoclonal de uno cualquiera de los ítems precedentes c)-i), en donde dicho anticuerpo se produce recombinantemente; y

k) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal de uno cualquiera de los ítems precedentes a)-j), en donde dicho fragmento

retiene la capacidad de unir específicamente a dicho antígeno CD40 humano.

Dicho anticuerpo o fragmento de este está libre de actividad agonista significativa, y por lo cual cuando dicho anticuerpo o fragmento de este se une a antígeno CD40 en dicha célula B, se inhibe el crecimiento o diferenciación de dicha célula B.

26. El método de la reivindicación 25, en donde dicho anticuerpo monoclonal se une a dicho antígeno CD40 humano con una afinidad (K_D) de al menos aproximadamente 10^{-6} M a aproximadamente 10^{-12} M.

27. El método de la reivindicación 25, en donde dicho fragmento se selecciona a partir del grupo que consiste de un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmentos Fv y un fragmento Fv de cadena sencilla.

28. El método de la reivindicación 25, en donde dicha enfermedad autoinmune se selecciona del grupo que consiste lupus sistémico eritematoso, púrpura trombocitopénica autoinmune, artritis Reumatoide, esclerosis múltiple, espondilitis anquilosante, miastenia gravis, y penfigus vulgaris.

29. Un método para tratar un cáncer caracterizado por la expresión del CD40, que comprende administrar a un paciente humano una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-CD40 humano seleccionado del grupo que consiste de:

a) el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12;

b) el anticuerpo monoclonal producido por la línea de célula de hibridoma de 5.9 o 12.12;

c) 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 e ID de SEC No.: 7, y ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 6, e ID de SEC No.: 8;

d) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácido 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 e ID de SEC No.: 4, y ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 2, e ID de SEC No.: 5;

e) un anticuerpo monoclonal que tiene una secuencia de aminoácido codificado 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, e ID de SEC No.: 3;

f) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo capaz de unir el anticuerpo monoclonal producido por la línea de célula de hibridoma 5.9 o 12.12;

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

h) 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;

i) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitivo;

j) el anticuerpo monoclonal del ítem precedente a) o un anticuerpo monoclonal de uno cualquiera de los ítems

precedentes c)-i), en donde dicho anticuerpo se produce recombinantemente; y

k) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal de uno cualquiera de los ítems precedentes a)-j), en donde dicho fragmento retiene la capacidad de unir específicamente a dicho antígeno CD40 humano.

Dicho anticuerpo o fragmento de este está libre de actividad agonista significativa, y por lo cual cuando dicho anticuerpo o fragmento de este se une a dicho antígeno CD40 en dicha célula B, se inhibe el crecimiento o diferenciación de dicha célula B.

30. El método de la reivindicación 29, en donde dicho anticuerpo monoclonal se une a dicho antígeno CD40 humano con una afinidad (K_D) de al menos aproximadamente 10^{-6} M a aproximadamente 10^{-12} M.

31. El método de la reivindicación 29, en donde dicho fragmento se selecciona a partir del grupo que consiste de un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmentos Fv y un fragmento Fv de cadena sencilla.

32. Un método 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 seleccionado del grupo que consiste de:

a) el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12;

b) el anticuerpo monoclonal producido por la línea de célula de hibridoma 5.9 o 12.12;

c) 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 e ID de SEC No.: 7, y ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 6, e ID de SEC No.: 8;

d) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácido 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 e ID de SEC No.: 4, y ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 2, e ID de SEC No.: 5;

e) un anticuerpo monoclonal que tiene una secuencia de aminoácido codificado por una molécula de ácido nucleico

434

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, e ID de SEC No.: 3;

f) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo capaz de unir el anticuerpo monoclonal producido por la línea de célula de hibridoma 5.9 o 12.12;

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

h) 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;

i) el anticuerpo monoclonal del ítem precedente a) o un anticuerpo monoclonal de uno cualquiera de los ítems precedentes c)-h), en donde dicho anticuerpo se produce recombinantemente; y

j) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal de uno cualquiera de los ítems precedentes a)-i), en donde dicho fragmento

retiene la capacidad de unir específicamente a dicho antígeno CD40 humano.

33. Un antagonista de anticuerpo monoclonal anti-CD40 que se une específicamente al dominio 2 del CD40.

34. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 33, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humano.

35. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 34, en donde dicho anticuerpo está libre de actividad agonista significativa.

36. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 33, en donde dicho anticuerpo tiene la especificidad de unión de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste del anticuerpo producido por la línea de célula hibridoma 5.9 y el anticuerpo producido por la línea de célula 12.12.

37. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 33, en donde dicho anticuerpo deselecciona del grupo que consiste del anticuerpo producido por la línea de célula de hibridoma depositado con el ATCC como Depósito de Patente No. PTA-5542 y línea de célula de hibridoma depositado con el ATCC como Depósito de Patente No. PTA-5543.

38. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 33, en donde dicho anticuerpo tiene la especificidad de unión del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9.

39. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 33, en donde dicho anticuerpo se une a un epítopo que cmprende los residuos 82-87 de la secuencia CD40 humana mostrada en la ID de SEC No.: 10 o ID de SEC No.: 12.

40. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 33, en donde dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de:

a) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácido 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 e ID de SEC No.: 4, y ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 2 y las ID de SEC No.: 5;

b) un anticuerpo monoclonal que tiene una secuencia de aminoácido codificado 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 las ID de SEC No.: 1 y en la ID de SEC No.: 3;

c) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo capaz de unir el anticuerpo monoclonal producido por la línea de célula de hibridoma 12.12;

d un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia CD40 humana mostrada en la ID de SEC No.: 10 o ID de SEC No.: 12;

e) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR 12.12 en un ensayo de unión competitivo; y

f) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o los anticuerpos monoclonales anteriores en los ítems precedentes (a)-(e), donde el fragmento retiene la capacidad de unir específicamente al antígeno CD40 humano.

41. El método para inhibir una trayectoria de señalización CD40 mediada por el ligando CD40 en una célula que expresa CD40 humano, dicho método comprende poner en contacto dicha célula con una cantidad efectiva de un

anticuerpo monoclonal anti-CD40 humano seleccionado del grupo que consiste de:

a) el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12;

b) el anticuerpo monoclonal producido por la línea de célula de hibridoma de 5.9 o 12.12;

c) 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 e ID de SEC No.: 7, y ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 6, e ID de SEC No.: 8;

d) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácido 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 e ID de SEC No.: 4, y ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 2, e ID de SEC No.: 5;

e) un anticuerpo monoclonal que tiene una secuencia de aminoácido codificado 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, e ID de SEC No.: 3;

f) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo capaz de unir el anticuerpo monoclonal producido por la línea de célula hibridoma 5.9 o 12.12;

g) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia CD40 humana mostrada en la ID de SEC No.: 10 o ID de SEC No.: 12;

h) 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;

i) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitivo;

j) el anticuerpo monoclonal del ítem precedente a) o un anticuerpo monoclonal de uno cualquiera de los ítems precedentes c)-i), en donde dicho anticuerpo se produce recombinantemente; y

k) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal de uno cualquiera de los ítems precedentes a)-j), en donde dicho fragmento retiene la capacidad de unir específicamente a dicho antígeno CD40 humano.

42. El método de la reivindicación 41, en donde dicho anticuerpo monoclonal se une a dicho antígeno CD40 humano con una afinidad (K_D) de al menos aproximadamente 10^{-6} M a aproximadamente 10^{-12} M.

43. El método de la reivindicación 41, en donde dicho fragmento se selecciona del grupo que consiste de un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmentos Fv y un fragmento Fv de cadena sencilla.

44. El método de la reivindicación 41, en donde dicha célula que expresa el CD40 es una céula B humana normal o una célula B humana maligna y dicha trayectoria de señalización CD40 es de supervivencia de célula B.

45. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal humano que es capaz de unir específicamente a un antígeno CD40 humano expresado en la superficie de la célula que expresa el CD40 humano, dicho anticuerpo monoclonal está libre de actividad agonista

significativa, en donde dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de:

a) el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12;

b) el anticuerpo monoclonal producido por la línea de célula de hibridoma de 5.9 o 12.12;

c) 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 e ID de SEC No.: 7, y ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 6, e ID de SEC No.: 8;

d) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácido 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 e ID de SEC No.: 4, y ambas secuencias mostradas en la ID de SEC No.: 2, e ID de SEC No.: 5;

e) un anticuerpo monoclonal que tiene una secuencia de aminoácido codificado 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, e ID de SEC No.: 3;

f) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo capaz de unir el anticuerpo monoclonal producido por la línea de célula de hibridoma 5.9 o 12.12;

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

h) 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;

i) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitivo;

j) el anticuerpo monoclonal del ítem precedente a) o un anticuerpo monoclonal de uno cualquiera de los ítems precedentes c)-i), en donde dicho anticuerpo se produce recombinantemente; y

k) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal de uno cualquiera de los ítems precedentes a)-j), en donde dicho fragmento retiene la capacidad de unión específica a dicho antígeno CD40 humano.

46. La composición farmacéutica de la reivindicación 45, en donde dicha composición es una formulación farmacéutica líquida que comprende un amortiguador en una cantidad para mantener el pH de la formulación en un rango de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0.

47. La composición farmacéutica de la reivindicación 46, en donde dicha formulación comprende adicionalmente un agente de isotonización en una cantidad que da la misma composición isotónica cercana.

48. La composición farmacéutica de la reivindicación 47, en donde dicho agente de isotonización es cloruro de sodio, dicho cloruro de sodio está presente en dicha formulación en una concentración de cerca de 50 mM a cerca de 300 mM.

49. La composición farmacéutica de la reivindicación 48, en donde dicho cloruro de sodio está presente es dicha formulación en una concentración de aproximadamente 150 mM.

444

50. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 46 a 49, en donde dicho amortiguador se selecciona del grupo que consiste de succinato, citrato, y amortiguadores de fosfato.

51. La composición farmacéutica de la reivindicación 50, en donde dicha formulación comprende dicho amortiguador en una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM.

52. La composición farmacéutica de la reivindicación 51, en donde dicho amortiguador es succinato de sodio o citrato de sodio en una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM.

53. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciónes 46 a 52, en donde dicha formulación comprende adicionalmente un tensoactivo en una cantidad de aproximadamente 0.001% a aproximadamente 1.0%.

54. La composición farmacéutica de la reivindicación 53, en donde dicho tensoactivo es polisorbato 80, que está presente en dicha formulación en una cantidad de aproximadamente 0.001% a cerca de 0.5%.

FIGURA 1A

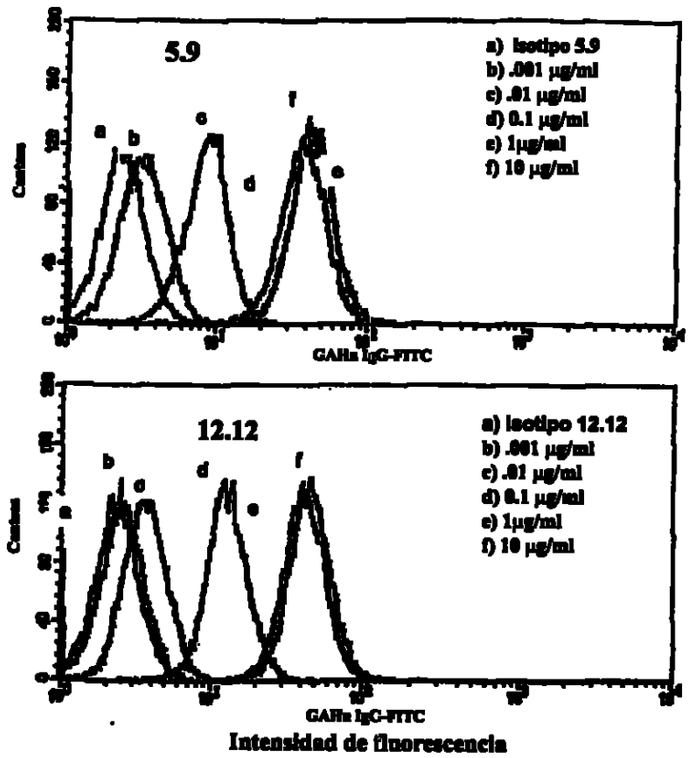


FIGURA 1B

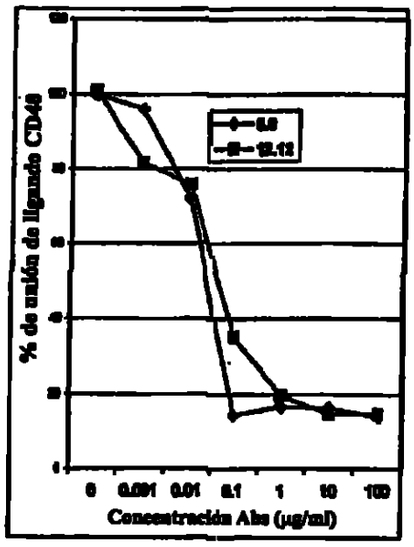

% de unión de ligando CD40
Concentración Abs (µg/ml)
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100

FIGURA 2A

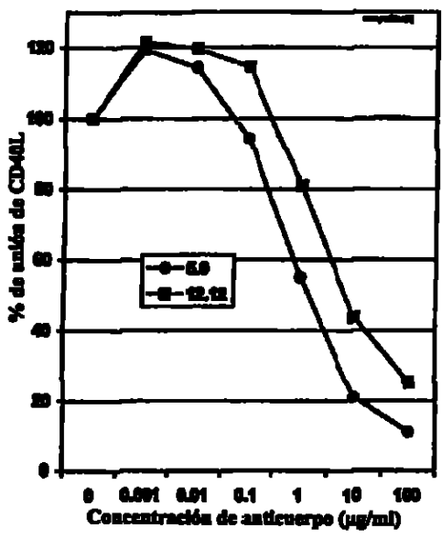

% de unión de CD40L
Concentración de anticuerpo (µg/ml)
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
5.9
12.12

FIGURA 2B

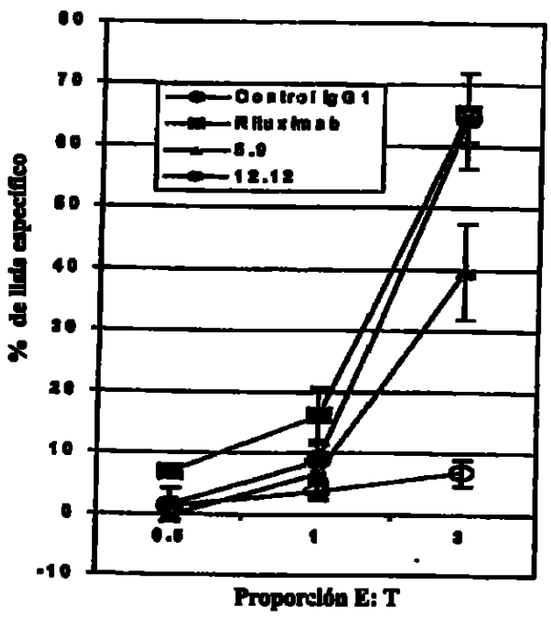

80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
% de lisis específico
Control IgG1
Rituximab
8.9
12.12
0.5
1
3
Proporción E: T

FIGURA 3A

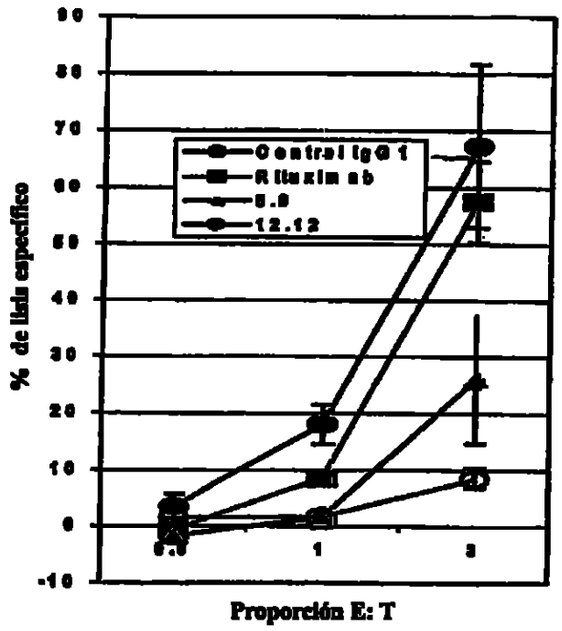

% de lisis específico
Proporción E: T
Control IgG 1
Rituxim ab
5.8
12.12

FIGURA 3B

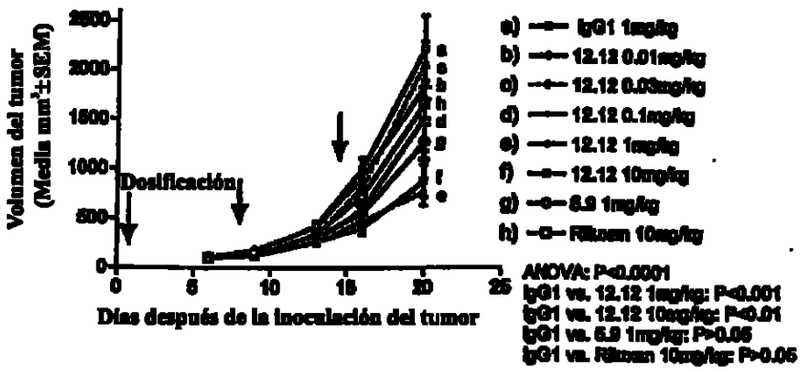

Volumen del tumor (Media mm³±SEM)
2500
2000
1500
1000
500
0
Dosificación
0
5
10
15
20
25
Días después de la inoculación del tumor
a) IgG1 1mg/kg
b) 12.12 0.01mg/kg
c) 12.12 0.03mg/kg
d) 12.12 0.1mg/kg
e) 12.12 1mg/kg
f) 12.12 10mg/kg
g) 6.9 1mg/kg
h) Rituxan 10mg/kg
ANOVA: P<0.0001
IgG1 vs. 12.12 1mg/kg: P<0.001
IgG1 vs. 12.12 10mg/kg: P<0.01
IgG1 vs. 6.9 1mg/kg: P>0.05
IgG1 vs. Rituxan 10mg/kg: P>0.05

FIGURA 4

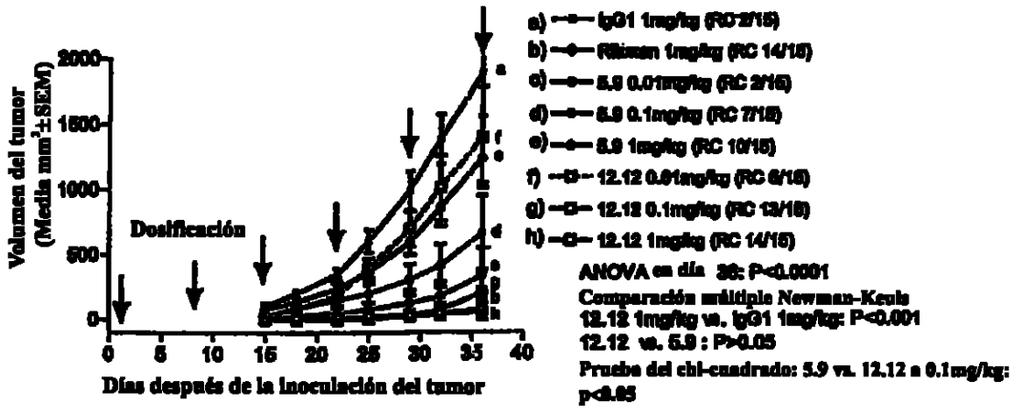

Volumen del tumor (Media mm³±SEM)
2000
1500
1000
500
0
Dosificación
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Días después de la inoculación del tumor
a) IgG1 1mg/kg (RC 2/15)
b) Rituxan 1mg/kg (RC 14/15)
c) 5.9 0.01mg/kg (RC 2/15)
d) 5.9 0.1mg/kg (RC 7/15)
e) 5.9 1mg/kg (RC 10/15)
f) 12.12 0.01mg/kg (RC 6/15)
g) 12.12 0.1mg/kg (RC 13/15)
h) 12.12 1mg/kg (RC 14/15)
ANOVA en día 36: P<0.0001
Comparación múltiple Newman-Keuls
12.12 1mg/kg vs. IgG1 1mg/kg: P<0.001
12.12 vs. 5.9 : P>0.05
Prueba del chi-cuadrado: 5.9 vs. 12.12 a 0.1mg/kg:
p<0.05

FIGURA 5

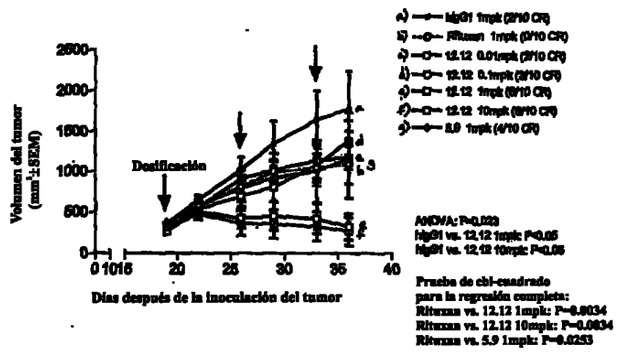

a) hIgG1 1mpk (2/10 CR)
b) Rituxan 1mpk (0/10 CR)
c) 12.12 0.01mpk (2/10 CR)
d) 12.12 0.1mpk (2/10 CR)
e) 12.12 1mpk (8/10 CR)
f) 12.12 10mpk (8/10 CR)
g) 5.9 1mpk (4/10 CR)
Volumen del tumor (mm³±SEM)
2500
2000
1500
1000
500
0
Dosificación
0 10 15 20 25 30 35 40
Días después de la inoculación del tumor
ANOVA: P=0.023
hIgG1 vs. 12.12 1mpk: P<0.05
hIgG1 vs. 12.12 10mpk: P<0.05
Prueba de chi-cuadrado
para la regresión completa:
Rituxan vs. 12.12 1mpk: P=0.0034
Rituxan vs. 12.12 10mpk: P=0.0034
Rituxan vs. 5.9 1mpk: P=0.0253

FIGURA 6

Número de moléculas de CD20 y CD40 en Células Ramalma 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 1e8 con 10% huSerum en PBS w/o Ca++ / Mg++ mas 0,1/ Azida de sodio en hielo durante 30 minutos.
3. Teñir las células con anticuerpos conjugados FITC (12.1F-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 Ug 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 (5,000 a 5,000MESF*), QuantumTM24 FITC (50,000 a 2,000,000 MESF) y Quantum TM24FITC (10,000 a 800,000 MESF)en la misma configuración de instrumento como para análisis de muestra. MESF: Moléculas de fluoreoromo 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 será 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 FITC conjugadas para cada anticuerpo proporción (F:P) para determinar la capacidad de unión de anticuerpos (ABC). ABC para huIgGFITC de muestra respectiva se corrige para obtenear el anticuerpo final de capacidad de unión.

	RAUDXI		RAMALWA	
Exp.	CD40	CD20	CD40	CD20
E090403	14409.0	92678.5	3296.4	6200.1
E091003	13214.9	108498.5	3081.5	4795.2
E091103	16702.6	100808.1	3165.7	3985.9
E091203	13278.9	128198.9	3164.9	4618.0
promedio	14,649.9	107,695.6	3,177.1	4,899.7
Stdev	846.7	14915.9	88.8	923.4

FIGURA 7

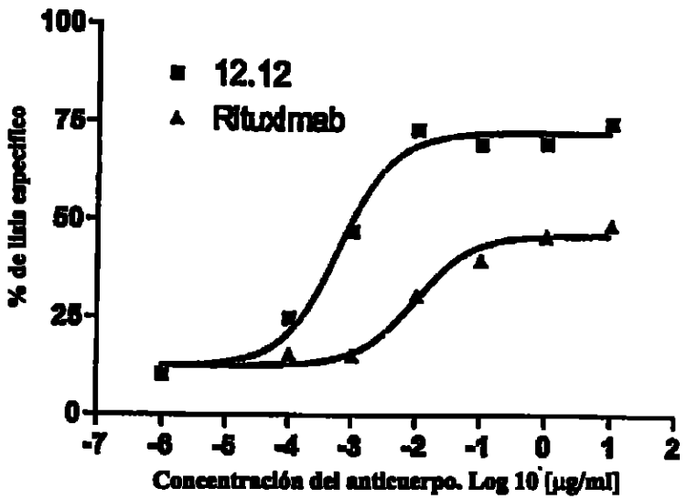

100
75
50
25
0
% de lisis específico
12.12
Rituximab
-7
-6
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Concentración del anticuerpo. Log 10 [µg/ml]

FIGURA 8

FIGURA 9A

Cadena liviana CHIR 12.12:

Líder:

MALPAQLLGLLMLWVSGSSG

variable:

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQVLIYLGSNRAS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQARQTPYTFGQGTKVDIR

Constante:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIGURA 9B

Cadena pasada CHIR-12.12:

Líder:

MEFGLSWVFLVALLRGVQC

variable:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYEGSNKYYAD
SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGIAARPGFDYWGQGTLVTVSS

Constante:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región constante alternativa:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURA 10A

Secuencia de ADN de cadena liviana de CHIR-12.12:

5'atgggctccctgtcagctcctgggggtgtaatgtctgggtctctggatccagtgggatattgtgatgacacagtctccactc
cctgaccgtcacccctggagagccggcctccatctcctgcaggtctagtcagagcctcctgcatagtaatggatacaactatttggatt
gtacctgcagaagccaggccagtctccacaggtcctgatctatttgggttctaatcgggcctccggggtcctgacaggttcagtggca
gtggatcaggcacagatttcacactgaaaatcagcagagtggaggtggaggttattactgcatgcaagctagacaaact
ccattcacttcggccctgggaccaaagtggatatcaaacgaa:tgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagt
tgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctc
aatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaa
agcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggg
gagagtgttag3'

FIGURA 10B

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

5'atggagtttgggctgagctgggttttccttgttgctattttaaaaggtgtccagtgtgaggtgcagttggtggagtctgggggaggc gt
ggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcacctttagtagctatggcatgcactgggtccgccaggct cc
aggcaaggggctggagtgggtggcagttatatcatatgatggaagtaatagatactatgcagactccgtgaagggccgattcacca
tctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctcagagctgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagat
ggagggtatagcagcagctggtactgctacttttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcgtcgaccaagggc
ccatccggtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccgg
tgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcag
cagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtgg
acaagagagttggtgagaggccagcacaggggaggagggtgtctgctggaagccaggctcagcgctcctgcctggacgcatcccg
gctatgcagcccagtccagggcagcaaggaggccgtctgcttgaccgaggcctgcccgcccctcatctgtcaagg
gatgaggtctctggctttttccccaggctctgggcaggcacaggctaggtgcccctaacccaggccctgcacacaaaggggcaggt
gctgggctcagacctgccaagagccatatccgggaggaccctgcccctgacctaagcccacccccaaaggccaaactctccactccc
tcagctcggacaccttctctcctcccagattccagtaactcccaatcttctctctgcagagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgc
ccaccgtgcccaggtaagccagcccaggcctcgccctccagctcaaggcgggacaggtgccctagagtagcctgcatccagggac
aggccccagccgggtgctgacacgtccacctccatctcttcctcagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccc
caaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtca
agttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgt
ggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcoc
ccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggtgggacccgtgggggtgcgaggggccacatggacagaggccggctcggcccaccc
tctgccctgagagtgaccgctgtaccaacctctgtccctacagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgg
gaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaa
tgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctatagcaagctcaccgtggac
aagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcc
ctgtctccgggtaaatga3'

FIGURA 11A

Cadena liviana CHIR-5.9:

Líder:

MDALLAQLLGLLMLWVPGSSG

variable:

AIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYKVSNRLSG
VPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQVTQFPFTFGQGTRLEIK

Constante:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIGURA 11B

Cadena pesada CHIR-5.9:

Líder:

MGWTAILALLLAVLQGVCA

variable:

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSP
SFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARSTAAGNDYYYYGMDVWGQGTTVTVS
S

Constante:

ASTKGPSVFPLAPASKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región constante alternativa:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURA 12A

Secuencia de codificación para isoforma corta CD40 para humano:

1 atggttcgtc tgcctctgca gtgcgtcctc tgggctgtgt tgctgacgcc tgtcccctcc
61 gaaccacccc atgcatgcag aaaaaacag tacctaataa acagtcagtg ctgttcttg
121 tgccagccag gacagaaact ggtgagtgac tgcacagagt tcactgaaac ggaatgcctt
181 cctgcgggtg aaagcgaatt cctagacacc tggaacagag agacacactg ccaccagcac
241 aaatactgcg acccgaacct agggcttcgg gtccagcaga agggcaccic agaaacagac
301 accatctgca cctgtaagga aggctggcac tgtacgagtg aggcctgtga gagctgtgtc
361 ctgcaccgct catgctcgcc cgggtttggg gtcaagcaga ttgctacagg agtttctgat
421 accatctgcg agccctgccc agtcggcttc ttctccaatg tgtcatctgc tttcgaaaaa
481 tgtcacccct ggacaagtgc ccaggagtcg gtgagagccc ctggtggtga tccccatcat
541 ctccgggatc ctgttgccgc tcttcttggt gctggtcttt atcaaaaagg tggccaagaa
601 gccaacaaat aa

FIGURA 12B

Isoforma corta codificada CD40 para humano:

1 mvrlpleovl wgcltavhp epptacreke yfnsqccal cqpgqkivse ctefttetcl
61 pcgeaefftt wnretheqh kycdpnlglr vqqkgtsetd tictcegwh ctsecescv
121 lhrscspgfg vkqiatgvsd ticepcpvgf fsnvsafekc hpwtsegg aeepggdphh
181 lrdpvchplg agiyqkggqe anq

FIGURA 12C

Secuencia de codificación para isoforma larga Cd40 para humanos:

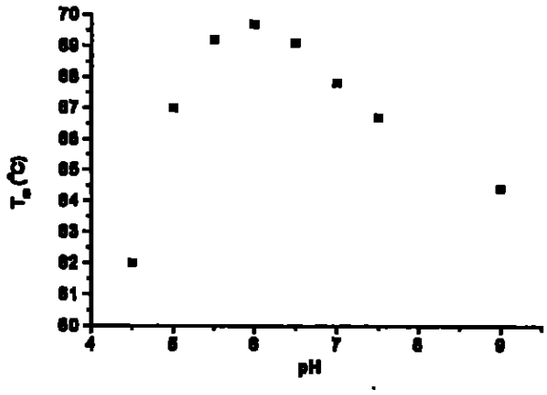
1 atggtcgtc tgcctctgca gtgcgtcctc tgggctgct tgctgaccgc tgtccatcca
61 gaaccaccca ctgcatgcag aaaaaacag tacctaatta accgtcagtg ctgttcttg
121 tgccagccag gacagaaact ggtgagtgac tgcacagagt tcactgaaac ggaatgcctt
181 cctgcgggtg aaagcgaatt cctagaccac tggaaccaag agaccatctg ccaccagcac
241 aaatactgcg acccaaacct agggcttcgg gtccagcaga agggcacctc agaaacagac
301 accatctgca cctgtaagaa aggctggcac tgtacgagtg aggtctgtga gagctgtgtc
361 ctgcaccgct cagactcgcc cggtcttgag gtcaagcaga tgctcacagg gctttctgat
421 accatctgcc tgcccctgcc agtgggcttc tccctcatg tgtatctgc ttcgaaaaa
481 tgtaaccctt ggaccagctg tgagaccaaa gaccgggtg tgcaacaggc aggcaccaac
541 aagactgatg tgtctgtgtg tcccccaggt cggttgaagg cccgtggtgt gatccccatc
601 acctcgggga tccgtttgc catcctctg gtgctggtct tcctcaaaa ggtggccaag
661 aagccaacca ataaggcccc ccacccccag caggaacccc aggagatcaa tttccccgac
721 gatcttcctg gctccaacac tgctgctcca gtgcaggaga ctttacatgg atgccaaccg
781 gtcacccagg aggatggcaa agagagtcgc atcacagtcc aggagagaca gtga

FIGURA 12D

Isoforma larga codificada de CC40 para humano:

1 mvrlplqcvl wgclltavhp epptacrekq ylinsqccsl cqpgqklvsd ctefteteel
61 pgceefldt wnrethchqh kycdpnlglr vqqkgtsetd tictcegwh ctseacesiv
121 lhrscspgfg vkqiatgvsd ticepcpvgf fsnvsafekc hpwtscetk dlvvqqagtn
181 ktdvvcgpqd rlralvvipi ifgilfaill vlvflkvak kpmkesplnp qepqeinfpd
241 dlpgsntaap vqetlhgcqp vtqedgkesr isvqerq

FIGURA 13



P-349

461

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 03/104 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del traductor al tiempo con la presente. Esta traducción ha sido preparada por Juan Pablo Piedrahita Aguilera, Traductor e Intérprete Oficial debidamente reconocido de conformidad con el Certificado de Idoneidad Profesional No. 0045 expedido por la Universidad Nacional de Colombia.

(Se traducen un Poder otorgado por Chiron Corporation, un Certificado Notarial y la Apostilla No. 152057, todo escrito en inglés).

CLARKE, MODET & CO. COLOMBIA

PODER

Yo (Nosotros) el (los) suscrito(s), representante(s) legal(es) de Chiron Corporation, sociedad organizada y existente bajo las leyes de Delaware y en desempeño en la actualidad de su actividad comercial, domiciliada en 4560 Horton Street, Emeryville, CA, 94608, EE.UU., por el presente otorgamos Poder a DIANA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMÁN, identificada con cédula de ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá y Tarjeta Profesional 20824 y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, identificada con Tarjeta Profesional 36448 y cédula de ciudadanía No 40.017.374 de Tunja, con domicilio en Santafé de Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre de la otorgante la representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante

TRADUCCION OFICIAL No. 03/104
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.

las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualesquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: Patentes de Invención, Modelos de Utilidad; Diseños Industriales, variedades vegetales, Marcas, Lemas, Nombres y Enseñas Comerciales y Denominaciones de Origen; así como sus renovaciones, prórrogas, traspasos, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.

2) Solicitar, tramitar, obtener, y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how o crédito mercantil.

3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, cesiones, traspasos, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.

4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reivindicaciones, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrán intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía; acciones

05 JUN 2008

TRADUCCION OFICIAL No 031 104
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

o juicios promovidos por el mandante o contra él.

5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.

6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, aceptar cláusulas compromisorias, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.

7) Ratificar o no la agencia oficiosa.

8) Así mismo facultamos a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en Chiron Corporation, Emeryville, CA, hoy día 19 de Marzol, 2003

Por: (Firmado) Steven W. Collier

Secretario Asistente

Chiron Corporation

CERTIFICADO NOTARIAL (Cuando el solicitante es una SOCIEDAD)

(Poderes otorgados en El Salvador, México, Estados Unidos de América y Venezuela)

El suscrito Notario CERTIFICA que:

TRADUCCION OFICIAL No 031
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

1). Steven W. Collier, (nombre de quien firma el poder), mayor de edad y domiciliado en Oakland CA, ,suscribió el anterior documento.

2) El otorgante le es conocido personalmente y tiene capacidad para firmar el documento.

3) El otorgante ha suscrito el anterior documento en su calidad de Secretario Asistente de la persona jurídica Chiron Corporation.

4) La mencionada persona jurídica con domicilio comercial en Emeryville CA, está debidamente constituida, tiene actualmente existencia legal y el fin para el cual se otorga este poder se encuentra dentro de su objeto social.

5) El otorgante tiene en efecto la capacidad referida y su representación es legal y está autorizado para otorgar este poder.

6) Fundamento las certificaciones 3), 4) y 5) en los documentos auténticos que para tal fin me fueron exhibidos.

(Firmado) Elissa M. Nash

Notario Público

(Sello Notarial a Tinta: Elissa M. Nash, Comisión No. 1262878, Notario Público, California, Condado de Alameda, Mi Comisión Vence Mayo 10, 2004)

Nota: El Consulado de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

Para todos los demás países el Señor Cónsul de Colombia o ante quien se

05 JUN 2006

n 3 / 1 0 4

ADUCCION FICIAL No.
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

otorgue, debe expedir una certificación dejando constancia de: 1) la existencia legal de la sociedad, 2) que cumple actualmente con su objeto social, y 3) que la persona o personas que otorgan este poder están facultadas para hacerlo. El Cónsul también certificará que los tuvo a la vista los documentos que prueban y acreditan tales circunstancias.

Estado de California

(Sello Pre-Impreso)

SECRETARIO DE ESTADO

APOSTILLA

(Convención de La Haya de Octubre 5 1961)

1. País: Estados Unidos de América

2. Este documento público

3. Ha sido firmado por Elissa M. Nash

Actuando en calidad de Notario Público, Estado de California

4. Lleva el sello/estampilla de Elissa M. Nash, Notario Público, Estado de California

CERTIFICADO

5. En Sacramento

6. El 11 de Abril del 2003

7. Por el Sub-Secretario de Estado, Estado de California

05 JUN 2006

TRADUCCION OFICIAL No. 03/104
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

8. No. 152057

9. Sello/Estamplilla

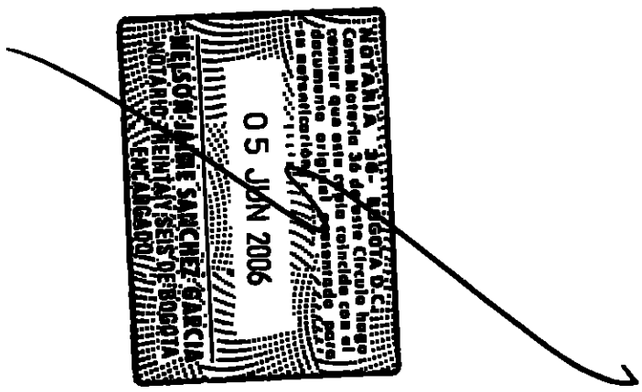
(Sello de Oblea del Estado de California, Sello a tinta del Secretario de Estado)
(Sello Redondo a Tinta del Secretario de Estado)

10. Firma (Firmado)
Kevin Shelley
Secretario de Estado
Por (Firmado) Ilegible

NP-24 A (Rev 1-03) osp 03 74700

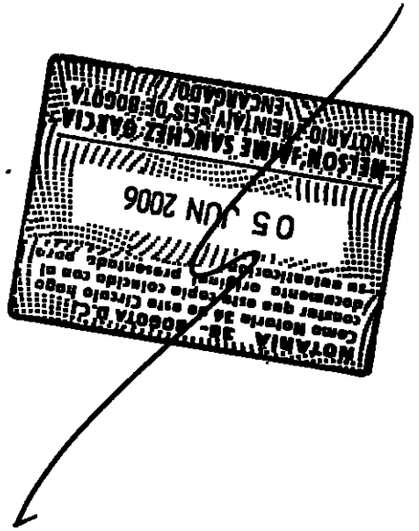
ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para su confrontación y a la cual me remito.

Bogotá, Mayo 27, 2003.



03/104

TRADUCCION OFICIAL No. _____
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA



CANCILLERIA DE RELACIONES

033078

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO PRESENTADO
LA

2006 JUN -1 A 10:3

JEFE DE LA OFICINA DE RELACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *Country: United States of America*
   This public document
2. *has been signed by Elissa M. Nash*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of Elissa M. Nash, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 7th day of April 2003*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 132057*
9. *Seal/Stamp:*

10. *Signature*

Kevin Shelley

KEVIN SHELLEY
Secretary of State

BY _____

NP-2- A (REV 1-03)

OSP 03 74700

892

COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, con Cédula de Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y enseñas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, cesiones, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, [illegible] administrativa o judicial, nulidad, [illegible] concesión de licencias, protección de secretos [illegible] y demás acciones y recursos relacionados con derechos [illegible] de los anteriormente indicados y en contra de la competencia [illegible] de la obtención o explotación de licencias, [illegible] de perjuicios. También podrá(n) intervenir en [illegible] civiles, comerciales, contencioso-administrativos, tutelas [illegible] en actuales o futuros juicios promovidos por el (la) mandante o en [illegible] el (la).
5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, [illegible] los hechos del proceso.
7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
8) Así mismo faculto (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en

a los días de

TRADUCCION OFICIAL
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
INTERPRETE OFICIAL
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned

Legal representative(s) of Chiron Corporation

An organization existing under the laws of Delaware

And in present execution of its business activity, domiciled at 4560 Horton Street, Emeryville, CA 94608, US

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, tp. 36448, identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, plant varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above- mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
5) To register domain names before the competant entity.
6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related objet and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
7) To ratify or not the officious agency.
8) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such sustitutions.

Granted and signed at Chiron Corporation, Emeryville, CA

on this 19th day of March of 2003

Firma / signature Steven W. Collier
Assistant Secretary
Chiron Corporation

CERTIFICADO NOTARIAL

(Cuando el solicitante es SOCIEDAD)
(Poderes otorgados en: El Salvador, Estados Unidos, México y Venezuela)

A los días del mes de de , el Notario que suscribe DA FE de que:

1. _____
(nombre de la persona que firma el poder)

mayor de edad y domiciliado _____ _____ firmó de su puño y letra el documento que antecede.

2. Conoce al (a la) otorgante y que este (a) está legalmente capacitado para el otorgamiento.

3. El otorgante ha firmado el referido documento en su carácter de_____ de la persona jurídica _____ _____

4. La citada persona jurídica con sede en _____ _____ está legalmente constituida, que tiene actualmente existencia legal y que el acto para el cual se ha otorgado este poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.

5. El otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta, que esta es legítima y que está facultado para otorgar este poder.

6. las anteriores certificaciones de los puntos 3, 4 y 5, me constan porque he tenido a la vista los documentos auténticos.

_____
Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Cónsul de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

CERTIFICADO NOTARIAL (Cuando el solicitante es [illegible])

A los días del mes de de el Notario que suscribe DA FE de que:

1. _____
(nombre de la persona que firma el poder)

mayor de edad y domiciliado en _____ _____ firmó en su presencia el documento que antecede, conoce al otorgante y que este está legalmente capacitado para el otorgamiento.

_____
Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Cónsul de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

Para todos las demás países el Señor Cónsul de Colombia o ante quien se otorgue, debe expedir una certificación dejando constancia 1) de la existencia legal de la sociedad, 2) de que esta ejerce actualmente su objeto social, y 3) de que la persona o personas que otorgan el poder están facultadas para hacerlo, dejando constancia así mismo de que tuvo a la vista las pruebas que acrediten tales circunstancias.

LEGALIZACIÓN POR EL CONSUL DE COLOMBIA O POR APOSTILLA

NOTARIAL CERTIFICATE

(When the applicant is a CORPORATION)
(Powers of attorney granted in: El Salvador, Mexico, U.S.A. and Venezuela)

This day of
The undersigned Notary CERTIFIES that:

1. Steven W. Collier
(name of the person who signs the power of attorney)

of legal age and domiciled in Oakland, CA set his hand on the foregoing document.

2. The grantor is to him personally known and that he/she has legal capacity to execute the document.

3. The grantor has executed the foregoing document in his capacity of Assistant Secretary of the juridical person Chiron Corporation

4. The mentioned juridical person with place of business in Emeryville, CA is duly organized, has actual legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

5. The grantor has in fact the referred quality and that his/her representation is legal and that he/she is empowered to grant this power of attorney.

6. I have based the above certifications 3, 4 and 5, on the authentic documents which for such purpose were exhibited to me.

_____
Notary Public
Elissa M. Nash

NOTA: Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary Public.

NOTARIAL CERTIFICATE (When the [illegible] INDIVIDUALS)

On this day of
The undersigned Notary CERTIFIES that:

1. _____
(name of the person who signs the Power of Attorney)

of legal age and domiciled at_____ _____ signed in his presence the foregoing document, the grantor is to him personally known and that he/she has legal capacity to execute the document.

_____
Notary Public

NOTA: Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary Public.

For all other countries the Colombian Consul or before who it is granted must issue a certification stating 1) the legal existence of the corporation, 2) that the corporate purposes are actually being accomplished , 3) that the person or persons who grant this Power of Attorney are empowered to do it. The Consul will certify also that the documents evidencing those circumstances were exhibited to him.

LEGALIZATION BY THE COLOMBIAN CONSUL OR BY APOSTILLE.

TRADUCCION OFICIAL No. _____
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-054042- -00000-0000
Fec: 2006-06-06 17:15:41 Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEYII
Eve: 378 FABENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 468

469

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCIÓN MODELO DE UTILIDAD	( )	(✓)
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	( )	(✓)
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	( )	(✓)
- Descripción de la invención.	( )	(✓)
- Dibujos de ser estos pertinentes.	( )	(✓)
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.		
COMPLETA (✓) INCOMPLETA	( )	( )
DISEÑO INDUSTRIAL ( )		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	( )	( )
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta	( )	( )
- la solicitud.		
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	( )	( )
Comprobante de pago de las tasas establecidas	( )	( )
COMPLETA ( ) INCOMPLETA	( )	( )
ESQUEMA DE TRAZADO ( )		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	( )	( )
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	( )	( )
Representación gráfica del esquema de trazado	( )	( )
Comprobante de pago de las tasas establecidas.	( )	( )
COMPLETA ( ) INCOMPLETA	( )	( )

Firma Responsable:

Fecha:

470

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

781

Doctor(a)
RODRIGUEZ DILIA MARIA
Apoderado(a) y/o Representante de
CHIRON CORPORATION

REFERENCIA	Radicación No.	06 54042
	Solicitud internacional	PCT/US2004/037152
	Fecha inicio fase nacional	04/06/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	0010174

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 08 SET. 2006
adpa11