



Organización y
Digitalización CSA Ltda

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

[Handwritten signature]

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

BI ✓

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

INVENTARIO

08-124345

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO "COMPOSICIONES FARMACEUTICAS DE ANTICUERPO ANTAGONISTA
ANTI-CD40"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C07K 16/28

71. SOLICITANTE NOVARTIS AG Y XOMA TECHNOLOGY LTD

DOMICILIO SUIZA Y ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO ALVARO CORREA ORDONEZ
TP 20281

22. BOGOTÁ, D. C., NOVIEMBRE 21, 2008

610

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-124345- -00001-0000

Fecha: 2008-11-24 16:14:58 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Fotos: 412

Señora

Alix Carmenza Céspedes de Vergel

Jefe de División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

Referencia: Expediente No. 08.124.345

Solicitud de Patente de Invención titulada: "Composiciones farmacéuticas de anticuerpo antagonista anti-cd40"

Solicitante: Novartis AG y Xoma Technologies Ltd.

COMPLEMENTO DE INFORMACIÓN

ÁLVARO CORREA ORDÓÑEZ, mayor de edad y vecino de Bogotá D.C., identificado según aparece al pie de mi firma, en mi condición de apoderado de la sociedad en referencia, manifiesto lo siguiente:

El día 21 de noviembre de 2008, bajo el número de radicación 08.124.345--00000, presenté solicitud de patente Fase Nacional para la solicitud internacional No. PCT/US2007/066757, para la cual adjunto los siguientes documentos originales: Petitorio, recibo de pago presentado por valor de \$501.000, Poder de Abogado otorgado por Novartis, AG, Cesión de Inventores, Copia de Solicitud Internacional, Traducción de Solicitud Internacional, Extracto y Tarjetas.

ÁLVARO CORREA ORDÓÑEZ

C.C.No.79.143.366 de Usaquén

T.P.20.281

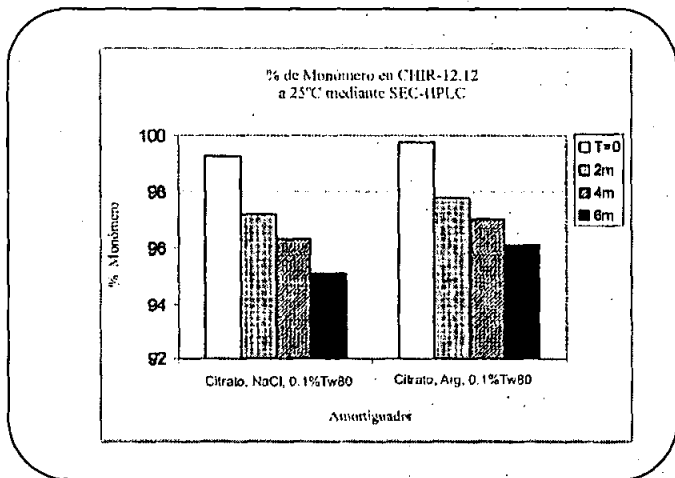
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional 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
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Extractos, Notificación de presentación de documento d prioridad y Reporte de Búsqueda y Opinión Escrita

11

FIGURA CARATERISTICA



12

Solicito la concesión de la patente

NOMBRE ALVARO CORREA ORDONEZ

FIRMA

C.C. 79.143.366 de Usaquén

T.P. 20.281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

00003

2008/019

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 82,789
FECHA : OCTUBRE 20 DE 2008

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	102249184	20/10/2008	55,994,500.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

00004

POD-02365

Legalizaciones correspondientes al PODER LEGAL expedido por Novartis AG

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

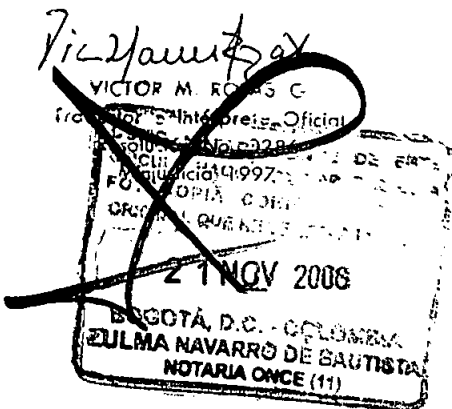
El 31 (treinta y uno) de Octubre de 2003, el suscrito Notario certifique

1. Que las siguientes personas ("Otorgantes") **Señor Heinz Mostosi, ciudadano de Basilea, Suiza**, mayor de edad y domiciliado en **Hofstetten SO, Suiza** y **Dr. Philip Grubb, ciudadano británico**, mayor de edad y domiciliado en **Inzlingen, Alemania**, firmaron el documento anterior.
2. Que conozco personalmente a los otorgantes y que tienen capacidad legal para otorgar el instrumento.
3. Que los otorgantes han otorgado el anterior documento como **signatarios autorizados, con firma conjunta**, de la persona jurídica.
4. Que la persona jurídica, **Novartis AG**, con domicilio en **Basilea, Suiza**, está debidamente organizada, tiene existencia legal actual y que los objetivos para los cuales se otorga este poder están dentro del campo de acción de los objetivos sociales.
5. Que los otorgantes de hecho han hecho referencia a la autorización y que su representación es legal.
6. Que he basado las afirmaciones 3, 4 y 5 anteriores en los siguientes documentos auténticos para tal fin que me fueron presentados y que mencione específicamente, dando sus fechas y el origen de su fuente:
 - Fotocopia auténtica (de la cual he tenido a la vista el original) del extracto del Registro de Comercio del Cantón de la Ciudad de Basilea de la firma Novartis AG, del 28 de Enero de 2003.

Firmado: Dr. M. Staehelin

Notario

Consecutivo No. 869/2003



APOSTILLE

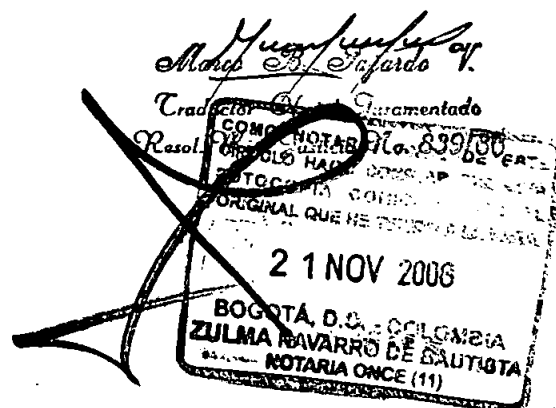
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Suiza
- El presente documento público
2. ha sido firmado por: el Dr. M. Staehelin,
3. en calidad de: Notario
4. lleva el sello / estampilla de: Notario

Certificado

5. en Basilea
6. el 31 de Octubre de 2003
7. por el Canciller del Estado del Cantón de la Ciudad de Basilea
8. Bajo el No. 9'288/16'665

9. Sello
- 10 Firma:
Heidi Fischer



000008

559

RAISBECK, LARA, RODRIGUEZ & RUEDA
MEMBERS OF THE FIRM
BAKER & MCKENZIE
ATTORNEYS AT LAW
AV 82 No. 10-82, 8TH FLOOR
BOGOTA, D.C. COLOMBIA
TELEPHONE (57-1) 634-1500
FACSIMILE (57-1) 370-2211
NIT 860.088.840-3
OFFICE.BOGOTA@BAKERNET.COM
WWW.BAKERNET.COM

POWER OF ATTORNEY

PODER

The undersigned.

La abajo firmada.

Novartis AG

located in

domiciliada en

Lichtstrasse 35, 4056 Basel, Switzerland

declares that it hereby grants to

declara por el presente otorgar a

ALVARO CORREA ORDÓÑEZ Y/O

ALVARO CORREA ORDÓÑEZ Y/O

RICARDO METKE MÉNDEZ

RICARDO METKE MÉNDEZ

a full and sufficient power of attorney to apply to the proper national officers and authorities for the issue of:

poder especial amplio y bastante para recabar de las oficinas y autoridades nacionales que correspondan, la obtención de:

Patents of Invention, Patents for Utility Models, Industrial Design Registrations, mergers, changes of name, assignments, filing and prosecution of oppositions, changes of address and annulment actions, these latter before the Council of State, to which and it empowers them to take all steps necessary before said authorities for the objects stated, to file petitions, prepare descriptions, make protests, declarations, appeals and objections, pay imposts, apply for certifications, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. To the said mandatories sufficient power is granted hereby to receive notifications for and on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the patents, and to do everything that may be required, before administrative or judicial officers of any class giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions if necessary.

Patentes de invención, Patentes de Modelo de Utilidad, Registro de Diseños Industriales, fusiones, cambios de nombre, cesiones, presentación y trámite de oposiciones, cambios de dirección, acciones de nulidad, estas últimas ante el Consejo de Estado, a cuyo efecto los faculta para dar ante dichas autoridades, todos los pasos necesarios al objeto indicado, elevar solicitudes, formular descripciones, protestas, declaraciones, apelaciones y reclamos, oblar impuestos, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percutir. Se concede a los expresados mandatarios poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de las patentes se presentaren y hacer cuanto fuere necesario, ante las autoridades administrativas o judiciales de cualquier orden, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y en caso necesario revocar dichas sustituciones.

Done and subscribed in

Dada y firmado en

On the day of

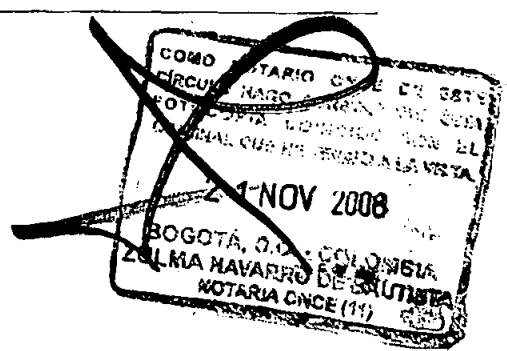
A los días del mes de

2003

2003

Novartis AG

H. Moscosi
Ph. Grubb



00007

NOTARIAL CERTIFICATION

On this **31st (thirty-first) day of October 2003**, the undersigned Notary certifies

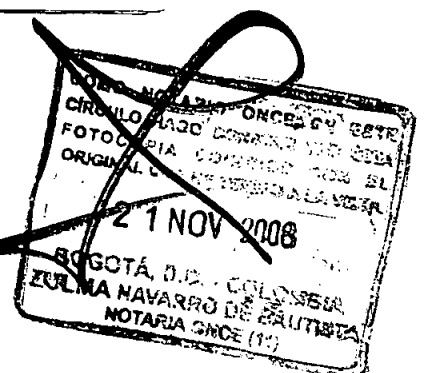
1. That the following persons ("grantors") being **Mr. Heinz Mostosi, citizen of Basel, Switzerland**, of legal age and domiciled in **Hofstetten SO, Switzerland** and **Dr. Philip Grubb, British citizen**, of legal age and domiciled in **Inzlingen, Germany** set their hand on the foregoing document.
2. That the grantors are to me personally known and that they have legal capacity to execute the instrument.
3. That the grantors have executed the foregoing document as **authorized signatories, both with joint signature**, of the judicial person.
4. That the judicial person, **Novartis AG**, having its home office in **Basel, Switzerland**, is duly organized, has present legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.
5. That the grantors have in fact the referred to authority and that their representation is legal.
6. That I have based certifications 3, 4 and 5 above on the following authentic documents for such purpose exhibited to me and which I mention specifically, giving their dates and their origin of source:

True photocopy (of which I have seen the original) of the Extract of the register of commerce of the Canton Basel-City of the firm Novartis AG, dated January 28, 2003

M. Staehelin, Notar

Dr. M. Staehelin
Notar

Leg. Prot. Nr. 869 /2008

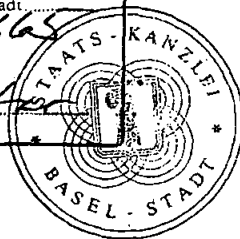


00008

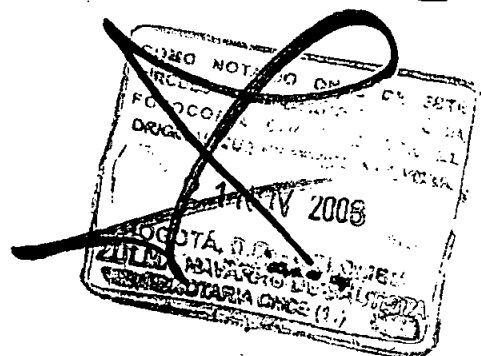
APOSTILLE
(Convention de la Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Schweiz (Suisse)
Diese öffentliche Urkunde
2. ist unterschrieben von *D. iur.
M. Stachelin*
3. in seiner Eigenschaft als *off. Verw.*
4. sie ist versehen mit dem Siegel/Stempel des (der)
Gemeinsamen

5. in Basel (Bâle) 6. am **31. Okt. 2003**
7. durch die Staat-kanzlei des Kantons Basel-Stadt
8. unter Nr. *9'288/16665*
9. Siegel/Stempel: 10. Unterschrift:
Fischer
Heidi Fischer



P 1998/038783



00009

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 615/08 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor. Esta es una Traducción Oficial efectuada el día 6 de noviembre de 2008 por la Sra. María Teresa Lara, c.c. 41.568.055 de Bogotá, Traductora Oficial según Resolución No. 01016 del 2 de octubre de 1998, expedida por el Ministerio de Justicia.

=====

Cesión de solicitud de patente a NOVARTIS AG. Certificación notarial suscrita por Kristin M. Graham, Notario Público del estado de Carolina del Norte, y legalizaciones subsiguientes.

CERTIFICADO

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE MINISTERIO DE JUSTICIA

La suscrita, Debra C. Jones, afirmo por el presente que el documento adjunto es copia fiel y correcta de un documento de cesión por el cual se traspasan todos los derechos e intereses sobre la Solicitud de Patente Provisional de los E.U. No. 60/794.011, presentada el 21 de abril de 2006, de los inventores Xiaofeng Lu, Bao-Lu Chen, Kidisti Araya y Augustus Okhamafe a Novartis AG.

Fecha: 9/30/08

(Fdo.) Debra C. Jones

CAROLINA DEL NORTE
CONDADO DE ALAMANCE

Yo, Kristin M. Graham, Notario Público para los antedichos condado y estado, certifico por el presente que Debra C. Jones compareció personalmente ante mí y reconoció haber suscrito debidamente la declaración anterior.

En constancia firmo y estampo mi sello a los 30 días del mes de septiembre de 2008.

(Fdo.) Kristin M. Graham

(SELLO) Kristin M. Graham Mi comisión expira: 4/12/2011
Notario Público
Mi comisión expira.
04/12/2011
Condado de Alamance, NC

OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS

SUBSECRETARIO DE COMERCIO PARA PROPIEDAD INTELECTUAL Y
DIRECTOR DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION 124-01-0160
DE INSTRUCCIONES

Abril 18, 2007

PTAS ***500260669A***

LESLIE T. HENRY
3201 BEECHLEAF COURT, SUITE 600
RALEIGH, NC 27604-1062

**OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS
AVISO DE REGISTRO DE DOCUMENTO DE CESIÓN**

El documento adjunto ha sido registrado por la División de Cesiones de la Oficina de Patentes y Marcas de los E.U. Una copia completa en microfilm se encuentra disponible en la Sala de Búsqueda de Cesiones en el Rollo y Número de Cuadro señalados a continuación.

Favor revisar toda la información contenida en este aviso. La información contenida en este aviso de registro refleja los datos presentes en el Sistema de Cesiones de Patentes y Marcas. En caso de encontrar cualquier error o de tener cualquier pregunta en relación con este aviso, se pueden poner en contacto con el empleado cuyo nombre aparece en este aviso, en el teléfono 571-272-3350. Favor enviar cualquier solicitud de corrección a: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

FECHA DE REGISTRO: 04/18/2007 ROLLO/CUADRO: 019177/0594
NÚMERO DE PÁGINAS: 9

CEDENTE:

FECHA DOC: 04/14/2007

CHEN, BAO-LU

FECHA DOC: 04/13/2007

ARAYA, KIDISTI

FECHA DOC: 04/17/2007

OKHAMAFE, AUGUSTUS

FECHA DOC: 04/13/2007

NOVARTIS AG
LICHTSTRASSE 35

FECHA DE PRESENTACIÓN: 04/21/2006

FECHA DE EXPEDICIÓN:

TÍTULO: COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS DE ANTICUERPOS ANTI-CD40 ANTAGONISTAS

SECCIÓN DE SERVICIOS DE CESIÓN
DIVISIÓN DE REGISTROS PÚBLICOS

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 0115
DE MINTUJUNA

CESIÓN DE PATENTE

04/18/2007

500260669

DATOS DEL CEDENTE

Nombre	Fecha de Otorgamiento
Xiaofeng Lu	04/14/2007
Bao-Lu Chen	04/13/2007
Kidisti Araya	04/17/2007
Augustus Akhamafe	04/13/2007

non12

DATOS DEL RECEPTOR

Nombre:	Novartis AG
Dirección:	Lichstrasse 35
Ciudad:	Basilea
Estado/País:	SUIZA
Código Postal:	CH-4056

NÚMEROS DE PROPIEDADES Total: 1

Tipo de Propiedad	Número
Número de Solicitud	60794011

DATOS PARA CORRESPONDENCIA

Número de Fax: (919) 862-2260

La correspondencia se enviará por Correo de los E.U. cuando no sea posible su envío por fax.

Teléfono: 9198622229

Email: polly.burton@alston.com

Nombre del Corresponsal: Leslie T. Henry

Dirección Renglón 1: 3201 Beechleaf Court, Suite 600

Dirección Renglón 4: Raleigh, CAROLINA DEL NORTE 27604-1062

NÚMERO DE EXPEDIENTE:	035784/308499
-----------------------	---------------

NOMBRE DEL REMITENTE:	Leslie T. Henry
-----------------------	-----------------

Total Anexos: 7

fuelle= 308499Assignment#page1.tif
fuelle= 308499Assignment#page2.tif
fuelle= 308499Assignment#page3.tif
fuelle= 308499Assignment#page4.tif
fuelle= 308499Assignment#page5.tif
fuelle= 308499Assignment#page6.tif
fuelle= 308499Assignment#page7.tif

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION RE. 0781
DE MINISTERIO

VERTICALMENTE, A UN LADO DEL CUADRO: CH \$40.00 60794011

nnn13

PATENTE
P028228.0001

CESIÓN

ESTA CESIÓN, vigente a partir del 21 de abril de 2006, es efectuada por nosotros, Xiaofeng Lu, ciudadano de la República Popular China, Bao-Lu Chen, ciudadano de los Estados Unidos de América, Kidisti Araya, ciudadano de los Estados Unidos de América y Augustus Okhamafe, ciudadano de los Estados Unidos de América.

CONSIDERANDO:

QUE los suscritos, en adelante denominados los **CEDENTES**, somos los inventores conjuntos de ciertas mejoras nuevas y útiles en **COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS DE ANTICUERPOS ANTI-CD40 ANTAGONISTAS** para las cuales se presentó una solicitud PROVISIONAL de patente de los Estados Unidos ante la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos el día 21 de abril de 2006 y lleva el No. de Solicitud 60/794,011, y

QUE **NOVARTIS AG**, sociedad suiza con domicilio principal en Lichstrasse 35, CH-4056 Basilea, Suiza, en adelante denominada la **CESIONARIA**, desea adquirir todo derecho, título e interés en y sobre dicho invento tal como se describe en dicha solicitud, y en y sobre toda y cualquier Patente que se otorgue para el mismo en los Estados Unidos de América y todos los países extranjeros;

AHORA, POR TANTO, a quien corresponda, conste por el presente que por contraprestación valiosa, el recibo y suficiencia de la cual se reconocen por el presente, hemos vendido y por la presente vendemos, cedemos, traspasamos y transferimos a la antedicha **CESIONARIA**, sus sucesores y cesionarios, todo derecho, título e interés en y sobre el citado invento y solicitud y en y sobre todas y cada una de las continuaciones, continuaciones en parte, divisiones o solicitudes no provisionales que reclamen la prioridad de la misma, y en y sobre todas y cada una de las Patentes de los Estados Unidos de América y todos los

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION 184-11-11
DE INTELIGENCIA

00014

países extranjeros o las reexpediciones o prórrogas de las mismas que puedan otorgarse para o sobre éste, hasta el final del término para el cual puedan otorgarse dichas Patentes, junto con el derecho a reclamar la prioridad de dicha solicitud en todos los países extranjeros de conformidad con el Convenio Internacional, para ser poseída y disfrutada por dicha **CESIONARIA**, sus sucesores y cesionarios, tan plena y totalmente como la misma habría sido poseída y disfrutada por nosotros de no haberse efectuado esta cesión y venta.

Los **CEDENTES** solicitan por la presente que dicha Patente se expida de acuerdo con lo señalado en esta cesión.

Los **CEDENTES** pactamos y acordamos además que, en el momento de la formalización y entrega del presente, poseemos el título pleno sobre el invento y las solicitudes antes mencionadas, y que poseemos el derecho y autoridad no restringidos para efectuar esta cesión.

Los **CEDENTES** acordamos adicionalmente que, sin cargo a dicha **CESIONARIA**, pero por cuenta de la **CESIONARIA**, colaboraremos con la **CESIONARIA** en el trámite de dicha solicitud y/o solicitudes, suscribiremos, verificaremos, reconoceremos y entregaremos los demás documentos, incluyendo solicitudes de Patente y de reexpedición de las mismas, e instrumentos de cesión y traspaso de éstas, y realizaremos los demás actos que la **CESIONARIA** pueda legalmente solicitar, para obtener o mantener Patentes para dicho invento y mejoras en todos y cada uno de los países, y revestir el título sobre las mismas en dicha **CESIONARIA**, o los sucesores y cesionarios de la **CESIONARIA**.

EN CONSTANCIA DE LO CUAL, los **CEDENTES** hemos colocado nuestras firmas y sellos en esta cesión en las fechas señaladas a continuación.

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION N° 07/018
DE INDEFINIDA

FECHA 14 de abril de 2007

(Fdo.) Xiaofeng Lu
Xiaofeng Lu

Estado de California)
) ss.
Condado de Alameda)

El suscrito, Harold L. Hoffman, Notario Público para los antedichos condado y estado, certifico por el presente que **Xiaofeng Lu** compareció personalmente ante mi en el día de hoy y reconoció el debido otorgamiento del instrumento anterior.

EN CONSTANCIA firmo y estampo mi sello oficial a los 14 días del mes de abril de 2007

(Fdo.) Harold L. Hoffman
Notario Público

[Sello] HAROLD L. HOFFMAN
COM. # 1509133
NOTARIO PÚBLICO - CALIFORNIA
CONDADO DE ALAMEDA
COM. EXPIRA SEPT. 11, 2008

Mi comisión expira: 9-11-2008

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION POR CREDITO
DE INSCRIPCION

RECONOCIMIENTO GENERAL - CALIFORNIA

Estado de California)
) ss.
Condado de Los Angeles)

El día 13 de abril de 2007, ante mí, Mary E. Moses, Notario Público, personalmente compareció Bao-Lu Chen, quien me demostró mediante pruebas satisfactorias ser la persona cuyo nombre suscribe el instrumento adjunto y reconoció ante mí haber otorgado el mismo en su carácter autorizado, y que mediante su firma en el instrumento la persona o entidad a nombre de la cual ella actuó, otorgó el instrumento.

EN CONSTANCIA firmo y estampo mi sello oficial.

(Fdo.) Mary E. Moses
Firma de la Notario Público

MARY E. MOSES
Comisión # 1603788
Notario Público - California
Condado de Los Angeles
Mi comisión expira el 1 de septiembre de 2009

Aunque la siguiente información no se requiere por ley, puede resultar valiosa para las personas que confíen en el documento y podría impedir la remoción fraudulenta y la reutilización de este formulario en otro documento.

Título o Tipo de Documento: Cesión

Número de Páginas: 6

Signatario(s) Distinto(s) del Anterior: ninguno

Nombre del Signatario: Bao Lu Chen

[X] Individuo
[] Funcionario Social Cargo(s):
[] Socio [] Comanditario [] General
[] Apoderado
[] Fideicomisario
[] Tutor o Curador
[] Otro: _____

El Signatario representa a: sí mismo

(Fdo.) Kidisti Araya
Kidisti Araya

[illegible]

El suscrito, Jacob Menough, Notario Público para los antedichos condado y estado, certifico por el presente que **Kidisti Araya** compareció personalmente ante mi en el día de hoy y reconoció el debido otorgamiento del instrumento anterior.

EN CONSTANCIA firmo y estampo mi sello oficial a los 17 días del mes de abril
de 2007

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01815
DE JUNIOSETIMA

[Sello] JACOB MENOUGH
COM. # 1505245
NOTARIO PÚBLICO - CALIFORNIA
CONDADO DE ALAMEDA
Mi com. expira Agosto 3, 2008

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01815
DE INMUNIZACION

- 2. Este documento público
ha sido firmado por KRISTIN M. GRAHAM
- 3. actuando en calidad de NOTARIO PÚBLICO
LA COMISIÓN EXPIRA 4/12/2011
- 4. lleva el sello/timbre de CONDADO DE ALAMANCE, CAROLINA DEL NORTE

CERTIFICADO

- 5. en Raleigh, Carolina del Norte
- 6. el día 3 DE OCTUBRE DE 2008
- 7. por la Secretario de Estado o el Subsecretario de Estado, Estado de Carolina del Norte
- 8. No. 25405
- 9. Sello/Timbre
- 10. Firma

(Sello del
Departamento de Estado
del Estado de
Carolina del Norte)

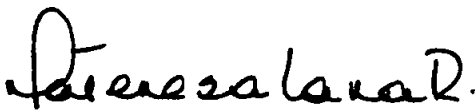
(Fdo.) Rodney S. Maddox
Por: **RODNEY S. MADDOX**
Subsecretario de Estado Principal

(Fdo.) Elaine F. Marshall
Secretaria de Estado

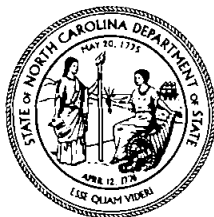
MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE 2 DE OCTUBRE DE 1998

=====

La anterior es traducción fiel y completa del documento en referencia, de la cual se deja copia en este archivo para su confrontación.


María Teresa Lara R.
c.c. 41.568.055 de Bogotá
Traductora Oficial según
Resolución No. 01016 del
2 de octubre de 1998, del
Ministerio de Justicia

STATE OF NORTH CAROLINA



Department of The
Secretary of State

APOSTILLE

(Convention de La Haye 5 octobre 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. This Public Document
has been signed by KRISTIN M. GRAHAM
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC
COMMISSION EXPIRES 4/12/2011
4. bears the seal/stamp of COUNTY OF ALAMANCE, NORTH CAROLINA

CERTIFIED

5. at Raleigh, North Carolina
6. the 3RD DAY OF OCTOBER, 2008
7. by Secretary of State or Deputy Secretary of State, State of North Carolina
8. No. 25405
9. Seal/Stamp
10. Signature



By:

Rodney S. Maddox
RODNEY S. MADDOX
Chief Deputy Secretary of State

Elaine J. Marshall

Secretary of State

D:LESLIE T. HENRY COMPANY:3201 BEECHLEAF COURT, SUITE 600

00021

**UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

APRIL 18, 2007

PTAS

500260669ALESLIE T. HENRY
3201 BEECHLEAF COURT, SUITE 600
RALEIGH, NC 27604-1062***500260669A***UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENTTHE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF
THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS
AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER
REFERENCED BELOW.PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE
INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA
PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD
FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY
CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 571-272-3350.
PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE,
MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 04/18/2007

REEL/FRAME: 019177/0594

NUMBER OF PAGES: 9

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).
DOCKET NUMBER: 035784/308499

ASSIGNOR:

LU, XIAOFENG

DOC DATE: 04/14/2007

ASSIGNOR:

CHEN, BAO-LU

DOC DATE: 04/13/2007

ASSIGNOR:

ARAYA, KIDISTI

DOC DATE: 04/17/2007

ASSIGNOR:

OKHAMAFE, AUGUSTUS

DOC DATE: 04/13/2007

ASSIGNEE:

NOVARTIS AG
LICHTSTRASSE 35

D:LESLIE T. HENRY COMPANY:3201 BEECHLEAF COURT, SUITE 600

BASEL, SWITZERLAND CH-4056

00022

019177/0594 PAGE 2

SERIAL NUMBER: 60794011

FILING DATE: 04/21/2006

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE: ANTAGONIST ANTI-CD40 ANTIBODY PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

ASSIGNMENT SERVICES BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.1

04/18/2007
500260669

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT										
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT										
CONVEYING PARTY DATA											
<table border="1"><thead><tr><th>Name</th><th>Execution Date</th></tr></thead><tbody><tr><td>Xiaofeng Lu</td><td>04/14/2007</td></tr><tr><td>Bao-Lu Chen</td><td>04/13/2007</td></tr><tr><td>Kidisti Araya</td><td>04/17/2007</td></tr><tr><td>Augustus Okhamafe</td><td>04/13/2007</td></tr></tbody></table>		Name	Execution Date	Xiaofeng Lu	04/14/2007	Bao-Lu Chen	04/13/2007	Kidisti Araya	04/17/2007	Augustus Okhamafe	04/13/2007
Name	Execution Date										
Xiaofeng Lu	04/14/2007										
Bao-Lu Chen	04/13/2007										
Kidisti Araya	04/17/2007										
Augustus Okhamafe	04/13/2007										
RECEIVING PARTY DATA											
<table border="1"><tr><td>Name:</td><td>Novartis AG</td></tr><tr><td>Street Address:</td><td>Lichtstrasse 35</td></tr><tr><td>City:</td><td>Basel</td></tr><tr><td>State/Country:</td><td>SWITZERLAND</td></tr><tr><td>Postal Code:</td><td>CH-4056</td></tr></table>		Name:	Novartis AG	Street Address:	Lichtstrasse 35	City:	Basel	State/Country:	SWITZERLAND	Postal Code:	CH-4056
Name:	Novartis AG										
Street Address:	Lichtstrasse 35										
City:	Basel										
State/Country:	SWITZERLAND										
Postal Code:	CH-4056										
PROPERTY NUMBERS Total: 1											
<table border="1"><thead><tr><th>Property Type</th><th>Number</th></tr></thead><tbody><tr><td>Application Number:</td><td>60794011</td></tr></tbody></table>		Property Type	Number	Application Number:	60794011						
Property Type	Number										
Application Number:	60794011										
CORRESPONDENCE DATA											
Fax Number: (919)862-2260 <i>Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.</i>											
Phone: 9198622229											
Email: polly.burton@alston.com											
Correspondent Name: Leslie T. Henry											
Address Line 1: 3201 Beechleaf Court, Suite 600											
Address Line 4: Raleigh, NORTH CAROLINA 27604-1062											
ATTORNEY DOCKET NUMBER:	035784/308499										
NAME OF SUBMITTER:	Leslie T. Henry										
Total Attachments: 7 source=308499Assignment#page1.tif											

CH \$40.00 60794011

D:\LESLIE T. HENRY COMPANY\3201 BEECHLEAF COURT, SUITE 600

00024

source=308499Assignment#page2.tif

source=308499Assignment#page3.tif

source=308499Assignment#page4.tif

source=308499Assignment#page5.tif

source=308499Assignment#page6.tif

source=308499Assignment#page7.tif

PATENT
P028228.0001

ASSIGNMENT

THIS ASSIGNMENT, effective April 21, 2006, made by us, Xiaofeng Lu, citizen of the People's Republic of China, Bao-Lu Chen, citizen of the United States of America, Kidisti Araya, citizen of the United States of America, and Augustus Okhamafe, citizen of the United States of America,

WITNESSETH: That,

WHEREAS, we, hereinafter referred to as **ASSIGNORS**, are the joint inventors of certain new and useful improvements in **ANTAGONIST ANTI-CD40 ANTIBODY PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS** for which a PROVISIONAL application for United States Letters Patent has been filed in the United States Patent and Trademark Office on April 21, 2006, and bears Application No. 60/794,011, and

WHEREAS **NOVARTIS AG**, a corporation of Switzerland having a principal place of business at Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel, Switzerland, hereinafter referred to as **ASSIGNEE**, is desirous of acquiring the entire right, title and interest in and to said invention as described in said application, and in and to any and all Letters Patent which shall be granted therefor in the United States of America and all foreign countries;

NOW, THEREFORE, To Whom It May Concern, be it known that for good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, we have sold and by these presents do hereby sell, assign, transfer, and convey unto the said **ASSIGNEE**, its successors and assigns, the entire right, title, and interest in and to the said invention and application, and in and to any and all continuations, continuations-in-part, divisions, or non-provisionals claiming priority thereof, and in and to any and all Letters Patent of the United States of America and all foreign countries or reissues or extensions thereof which may be granted therefor or thereon, for the full end of the term for which said Letters Patent may be granted, together with the right to claim the priority of said application in all foreign countries in accordance with the International Convention, the same to be held and enjoyed by said **ASSIGNEE**, its successors and assigns, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by us if this assignment and sale had not been made.

ASSIGNORS hereby request that said Letters Patent be issued in accordance with this assignment.

ASSIGNORS further covenant and agree that, at the time of the execution and delivery of these presents, we possess full title to the invention and the subject applications above-mentioned, and that we have the unencumbered right and authority to make this assignment.

ASSIGNORS further agree that we will, without charge to said **ASSIGNEE**, but at **ASSIGNEE'S** expense, cooperate with **ASSIGNEE** in the prosecution of said application and/or applications, execute, verify, acknowledge and deliver all such further papers, including applications for Letters Patent and for the reissue thereof, and instruments of assignment and transfer thereof, and will perform such other acts as **ASSIGNEE** lawfully may request, to obtain or maintain Letters Patent for said invention and improvement in any and all countries, and to vest title thereto in said **ASSIGNEE**, or **ASSIGNEE'S** successors and assigns.

IN WITNESS WHEREOF, **ASSIGNORS** have hereunto set our hands and seals to this assignment on the dates indicated below.

DATE 14 APR 07

Xiaofeng Lu
Xiaofeng Lu

STATE OF California

COUNTY OF Alameda

I, Harold L. Hoffman, a Notary Public for said County and State, do hereby certify that Xiaofeng Lu personally appeared before me this day and acknowledged the due execution of the foregoing instrument.

Witness my hand and official seal, this the 14th day of April, 2007.



Harold L. Hoffman
Notary Public
Harold L. Hoffman

My commission expires: 9.11.2008

000028

DATE 13 APR 2007

Bao-Lu Chen
Bao-Lu Chen

STATE OF _____)
COUNTY OF _____)

I, _____, a Notary Public for said County and State, do hereby
certify that **Bao-Lu Chen** personally appeared before me this day and acknowledged the due
execution of the foregoing instrument.

Witness my hand and official seal, this the _____ day of _____, 2007.

(Official Seal)

Notary Public

My commission expires: _____

See ATTACHED CALIFORNIA ALL-PURPOSE
ACKNOWLEDGMENT

00029

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of Los Angeles

On APRIL 13, 2007 before me, MARY E. MOSES, NOTARY PUBLIC
Date Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")

personally appeared BAD LU CHEN
Name(s) of Signer(s)

☐ personally known to me

☒ (or proved to me on the basis of satisfactory evidence)

to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.



WITNESS my hand and official seal.

Mary E. Moses
Signature of Notary Public

Place Notary Seal Above

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: ASSIGNMENT

Document Date: APRIL 21, 2006 Number of Pages: 6

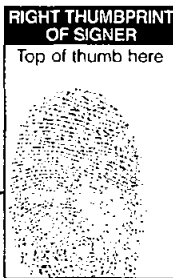
Signer(s) Other Than Named Above: NO OTHER SIGNERS

Capacity(ies) Claimed by Signer(s)

Signer's Name: BAD LU CHEN

- ☒ Individual
☐ Corporate Officer — Title(s): _____
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney in Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

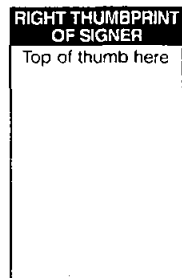
Signer Is Representing: SELF



Signer's Name: _____

- ☐ Individual
☐ Corporate Officer — Title(s): _____
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney in Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____



DATE 17 APR 07
~~16 APR 07~~

Kidisti Araya
Kidisti Araya

STATE OF California
COUNTY OF Alameda

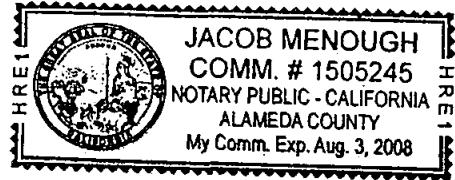
I, Jacob Menough, a Notary Public for said County and State, do hereby certify that **Kidisti Araya** personally appeared before me this day and acknowledged the due execution of the foregoing instrument.

Witness my hand and official seal, this the 17TH day of April, 2007.

(Official Seal)

[Signature]
Notary Public

My commission expires: 8/3/08



00031

DATE 13 APRIL 2007

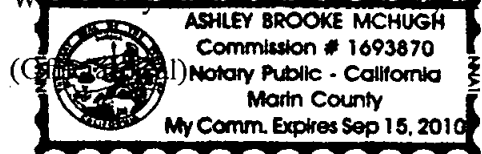
Augustus Okhamafe
Augustus Okhamafe

STATE OF California

COUNTY OF Marin

I, Ashley Mchugh, a Notary Public for said County and State, do hereby certify that Augustus Okhamafe personally appeared before me this day and acknowledged the due execution of the foregoing instrument.

Witness my hand and official seal this the 13th day of April, 2007.



Ashley Mchugh
Notary Public

My commission expires: 9/15/2010

#30323091
(035784/308499)

000032

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 614/08 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor. Esta es una Traducción Oficial efectuada el día 6 de noviembre de 2008 por la Sra. María Teresa Lara, c.c. 41.568.055 de Bogotá, Traductora Oficial según Resolución No. 01016 del 2 de octubre de 1998, expedida por el Ministerio de Justicia.

=====

Cesión de solicitud de patente de Novartis AG a XOMA Technology Ltd.
Certificación notarial suscrita por Kristin M. Graham, Notario Público del estado de Carolina del Norte, y legalizaciones subsiguientes.

CERTIFICADO

La suscrita, Debra C. Jones, afirmo por el presente que el documento adjunto es copia fiel y correcta de un documento de cesión por el cual se traspasa el 50% de los derechos e intereses sobre la Solicitud de Patente Provisional de los E.U. No. 60/794.011, presentada el 21 de abril de 2006 de Novartis AG a XOMA Technology Ltd.

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE MINISTERIO DE JUSTICIA

Fecha: 9/30/08

(Fdo.) Debra C. Jones

CAROLINA DEL NORTE
CONDADO DE ALAMANCE

Yo, Kristin M. Graham, Notario Público para los antedichos condado y estado, certifico por el presente que Debra C. Jones compareció personalmente ante mí y reconoció haber suscrito debidamente la declaración anterior.

En constancia firmo y estampo mi sello a los 30 días del mes de septiembre de 2008.

(Fdo.) Kristin M. Graham

(SELLO) Kristin M. Graham
Notario Público
Mi comisión expira:
04/12/2011
Condado de Alamance, NC

Mi comisión expira: 4/12/2011

OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS

SUBSECRETARIO DE COMERCIO PARA PROPIEDAD INTELECTUAL Y
DIRECTOR DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS

Mayo 09, 2007

PTAS

500273946A

LESLIE T. HENRY
3201 BEECHLEAF COURT, SUITE 600
RALEIGH, NC 27604-1062

**OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS
AVISO DE REGISTRO DE DOCUMENTO DE CESIÓN**

El documento adjunto ha sido registrado por la División de Cesiones de la Oficina de Patentes y Marcas de los E.U. Una copia completa en microfilm se encuentra disponible en la Sala de Búsqueda de Cesiones en el Rollo y Número de Cuadro señalados a continuación.

Favor revisar toda la información contenida en este aviso. La información contenida en este aviso de registro refleja los datos presentes en el Sistema de Cesiones de Patentes y Marcas. En caso de encontrar cualquier error o de tener cualquier pregunta en relación con este aviso, se pueden poner en contacto con el empleado cuyo nombre aparece en este aviso, en el teléfono 571-272-3350. Favor enviar cualquier solicitud de corrección a: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

FECHA DE REGISTRO: 05/09/2007

ROLLO/CUADRO: 019270/0645
NÚMERO DE PÁGINAS: 5

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 0785
DE MINISTERIO

000034

RESUMEN: Cesión del interés del cedente (ver documento para detalles).
NÚMERO DE EXPEDIENTE: 035784/308499

CEDENTE:

NOVARTIS AG

FECHA DOC: 05/09/2007

CESIONARIO:

XOMA TECHNOLOGY LTD.
2910 SEVENTH STREET
BERKELEY, CALIFORNIA 94710

NÚMERO DE SERIE: 60794011 FECHA DE PRESENTACIÓN: 04/21/2006
NÚMERO DE PATENTE: FECHA DE EXPEDICIÓN:
TÍTULO: COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS DE ANTICUERPOS ANTI-CD40
ANTAGONISTAS

SECCIÓN DE SERVICIOS DE CESIÓN
DIVISIÓN DE REGISTROS PÚBLICOS

CESIÓN DE PATENTE

Versión Electrónica v1.1 05/09/2007
Versión en Hoja de Estilo v1.1 500273946

TIPO DE PRESENTACIÓN:	NUEVA CESIÓN
NATURALEZA DEL TRASPASO:	CESIÓN

DATOS DEL CEDENTE

Nombre	Fecha de Otorgamiento
Novartis AG	05/09/2007

DATOS DEL RECEPTOR

Nombre:	XOMA Technology Ltd.
Dirección:	2910 Seventh Street
Ciudad:	Berkeley
Estado/País:	CALIFORNIA
Código Postal:	94710

NÚMEROS DE PROPIEDADES Total: 1

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 614/08
DE MINISTERIO

00035

Tipo de Propiedad	Número
Número de Solicitud	60794011

DATOS PARA CORRESPONDENCIA

Número de Fax: (919) 862-2260

La correspondencia se enviará por Correo de los E.U. cuando no sea posible su envío por fax.

Teléfono: 9198622229

Email: polly.burton@alston.com

Nombre del Corresponsal: Leslie T. Henry

Dirección Renglón 1: 3201 Beechleaf Court, Suite 600

Dirección Renglón 4: Raleigh, CAROLINA DEL NORTE 27604-1062

NÚMERO DE EXPEDIENTE:	035784/308499
-----------------------	---------------

NOMBRE DEL REMITENTE:	Leslie T. Henry
-----------------------	-----------------

Total Anexos: 4

fuelle= 308499NovartisAGtoXomaAssignment#page1.tif

fuelle= 308499NovartisAGtoXomaAssignment#page2.tif

fuelle= 308499NovartisAGtoXomaAssignment#page3.tif

fuelle= 308499NovartisAGtoXomaAssignment#page4.tif

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01015
DE MINISTERIO

VERTICALMENTE, A UN LADO DEL CUADRO: **CH \$40.00 60794011**

PP028228.0001

CESIÓN

ESTA CESIÓN, vigente a partir del 22 de abril de 2006, es efectuada por **NOVARTIS AG**, sociedad suiza, con domicilio principal en Lichstrasse 35, CH-4056, Basilea, Suiza,

CONSIDERANDO:

QUE NOVARTIS AG, en adelante denominada la **CEDENTE**, adquirió previamente todo derechos, título e interés en y sobre ciertas mejoras nuevas y útiles en **COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS DE ANTICUERPOS ANTI-CD40 ANTAGONISTAS** para las cuales se presentó una solicitud PROVISIONAL ante la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos el día 21 de abril de 2006 y lleva el No. de Solicitud 60/794,011, y

QUE **XOMA TECHNOLOGY LTD.**, sociedad de Bermuda, con domicilio principal en 2910 Seventh Street, Berkeley, CA 94710, en adelante denominada la **CESIONARIA**, desea adquirir el cincuenta por ciento (50%) de los derechos, título e interés en y sobre dicho invento tal como se describe en dicha solicitud, y en y sobre toda y cualquier Patente que se otorgue para el mismo en los Estados Unidos de América y todos los países extranjeros; y

QUE las partes han acordado la cesión señalada a continuación;

AHORA, POR TANTO, a quien corresponda, conste por el presente que por contraprestación valiosa, el recibo y suficiencia de la cual se reconocen por el presente, la antedicha **CEDENTE** ha vendido y por la presente vende, cede, traspasa y transfiere a la antedicha **CESIONARIA**, sus sucesores y cesionarios, un derecho, título e interés indivisos del cincuenta por ciento (50%) en y sobre la citada solicitud y dichas Patentes, y los inventos representados por la misma, y todas y cada una de las continuaciones, continuaciones en parte, divisiones o solicitudes no provisionales que reclamen la prioridad de las mismas, y todas y cada una de las Patentes o reexpediciones, reexámenes o prórrogas de las mismas que puedan otorgarse para o sobre éstas, hasta el final del término para el cual puedan otorgarse dichas Patentes, junto con el derecho a reclamar prioridad en todos los países extranjeros de conformidad con el Convenio Internacional; un interés indiviso del cincuenta por ciento (50%) en los derechos que corresponden a tales Patentes en países extranjeros en todo el mundo; y un interés indiviso del cincuenta por ciento (50%) en los derechos a demandar por

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION RE-0110
DE INTERVENCIÓN

MARIA TERESA LARA R.
 TRADUCTORA OFICIAL
 RESOLUCION No. 00089
 DE ABRIL 1978

La **CEDENTE** pacta y acuerda además que, en el momento de la formalización y entrega del presente, posee el título pleno sobre los inventos y las Patentes para los mismos identificadas previamente, y que posee un derecho y autoridad no restringidos para efectuar esta cesión.

NOVARTIS AG

XOMA TECHNOLOGY LTD.

Por: (Fdo.) Anne Dollard
Su: Secretaria Asistente

RECONOCIMIENTO GENERAL - CALIFORNIA

Estado de California)
) ss.
 Condado de Alameda)

El día 9 de mayo de 2007, ante mí, Elissa M. Nash, personalmente comparecieron Amy Hessler y Susan Abrahamson, a quienes conozco personalmente como las personas cuyos nombre suscriben el instrumento adjunto y reconocieron ante mí haber otorgado el mismo en su carácter autorizado, y que mediante su firma en el instrumento la persona o entidad a nombre de la cual ellas actuaron, otorgó el instrumento.

EN CONSTANCIA firmo y estampo mi sello oficial.

(Fdo.) Elissa M. Nash
 Firma de la Notario Público

[Sello]

ELISSA M. NASH
 Comisión # 1553873
 Notario Público - California
 Condado de Alameda
 Mi comisión expira el 19 de febrero de 2009

_____ OPCIONAL _____

Aunque la siguiente información no se requiere por ley, puede resultar valiosa para las personas que confíen en el documento y podría impedir la remoción fraudulenta y la reutilización de este formulario en otro documento.

Descripción del Documento Adjunto

Título o Tipo de Documento: Cesión

Fecha del Documento: Abril 22, 2006

Número de Páginas:

Signatario(s) Distinto(s) del Anterior:

Calidad(es) Reclamada(s) por el(los) Signatario(s)

Nombre del Signatario: Amy Hessler y Susan Abrahamson

PULGAR DERECHO
 DEL SIGNATARIO

☐ Individuo

☒ Funcionario Social Cargo(s): Representantes Autorizadas

☐ Socio ☐ Comanditario ☐ General

☐ Apoderado

☐ Fideicomisario

☐ Tutor o Curador

☐ Otro: _____

El Signatario representa a: Novartis AG

MARIA TERESA LARA R.
 TRADUCTORA OFICIAL
 RESOLUCION No. 0818
 DE 1997

RECONOCIMIENTO GENERAL - CALIFORNIA

Estado de California)
) ss.
Condado de Alameda)

El día 9 de mayo de 2007, ante mí, Lisa M. Peterson, Notario Público, personalmente compareció Anne Dollard, a quien conozco personalmente como la persona cuyo nombre suscribe el instrumento adjunto y reconoció ante mí haber otorgado el mismo en su carácter autorizado, y que mediante su firma en el instrumento la persona o entidad a nombre de la cual ella actuó, otorgó el instrumento.

EN CONSTANCIA firmo y estampo mi sello oficial.

(Fdo.) Lisa M. Peterson
Firma de la Notario Público

[Sello] LISA M. PETERSON
COM. # 1449044
NOTARIO PÚBLICO - CALIFORNIA
CONDADO DE SAN FRANCISCO
Mi comisión expira el 3 de noviembre de 2007

TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION EN AYUNTAMIENTO
DE MINUTERIA

_____ OPCIONAL _____

Aunque la siguiente información no se requiere por ley, puede resultar valiosa para las personas que confíen en el documento y podría impedir la remoción fraudulenta y la reutilización de este formulario en otro documento.

Descripción del Documento Adjunto

Título o Tipo de Documento: Cesión
Fecha del Documento: Mayo 9, 2007 Número de Páginas: dos
Signatario(s) Distinto(s) del Anterior:

Calidad(es) Reclamada(s) por el(los) Signatario(s)

Nombre del Signatario: PULGAR DERECHO DEL SIGNATARIO
[] Individuo
[X] Funcionario Social Cargo(s): Secretaria Asistente
[] Socio [] Comanditario [] General
[] Apoderado
[] Fideicomisario
[] Tutor o Curador
[] Otro: _____

El Signatario representa a: Xoma Technology Ltd.

00040

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

- 1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
- 2. Este documento público
ha sido firmado por KRISTIN M. GRAHAM
- 3. actuando en calidad de NOTARIO PÚBLICO
LA COMISIÓN EXPIRA 4/12/2011
- 4. lleva el sello/timbre de CONDADO DE ALAMANCE, CAROLINA DEL NORTE

CERTIFICADO

- 5. en Raleigh, Carolina del Norte
- 6. el día 3 DE OCTUBRE DE 2008
- 7. por la Secretario de Estado o el Subsecretario de Estado, Estado de Carolina del Norte
- 8. No. 25404
- 9. Sello/Timbre
- 10. Firma

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCIÓN No. 01016
DE OCTUBRE DE 1998

(Sello del
Departamento de Estado
del Estado de
Carolina del Norte)

(Fdo.) Rodney S. Maddox
Por: **RODNEY S. MADDOX**
Subsecretario de Estado Principal

(Fdo.) Elaine F. Marshall
Secretaria de Estado

=====

La anterior es traducción fiel y completa del documento en referencia, de la cual se deja copia en este archivo para su confrontación.

Maria Teresa Lara R.
María Teresa Lara R.
c.c. 41.568.055 de Bogotá
Traductora Oficial según
Resolución No. 01016 del
2 de octubre de 1998, del
Ministerio de Justicia

STATE OF NORTH CAROLINA



Department of The
Secretary of State

APOSTILLE

(Convention de La Haye 5 octobre 1961)

1. COUNTRY: **UNITED STATES OF AMERICA**
2. This Public Document
has been signed by KRISTIN M. GRAHAM
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC
COMMISSION EXPIRES 4/12/2011
4. bears the seal/stamp of COUNTY OF ALAMANCE, NORTH CAROLINA

CERTIFIED

5. at Raleigh, North Carolina
6. the 3RD DAY OF OCTOBER, 2008
7. by Secretary of State or Deputy Secretary of State, State of North Carolina
8. No. 25404
9. Seal/Stamp
10. Signature



By:

Rodney S. Maddox
RODNEY S. MADDOX
Chief Deputy Secretary of State

Claine J. Marshall

Secretary of State

ESLIE T. HENRY COMPANY 3201 BEECHLEAF COURT, SUITE 600

00043

ALSTON & BIRD
RTA
RECEIVED5/15/07
pu

Alston & Bird

MAY 14 2007

Received By _____

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

MAY 09, 2007

PTAS

500273946A

500273946A

LESLIE T. HENRY
3201 BEECHLEAF COURT, SUITE 600
RALEIGH, NC 27604-1062UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 05/09/2007

REEL/FRAME: 019270/0645

NUMBER OF PAGES: 5

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).
DOCKET NUMBER: 035784/308499ASSIGNOR:
NOVARTIS AG

DOC DATE: 05/09/2007

ASSIGNEE:
XOMA TECHNOLOGY LTD.
2910 SEVENTH STREET
BERKELEY, CALIFORNIA 94710

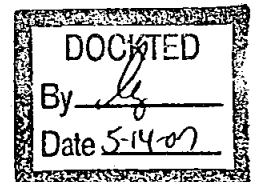
SERIAL NUMBER: 60794011

FILING DATE: 04/21/2006

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE: ANTAGONIST ANTI-CD40 ANTIBODY PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS



ESLIE T. HENRY COMPANY:3201 BEECHLEAF COURT, SUITE 600

00045

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.105/09/2007
500273946

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT
CONVEYING PARTY DATA	
Name	Execution Date
Novartis AG	05/09/2007
RECEIVING PARTY DATA	
Name:	XOMA Technology Ltd.
Street Address:	2910 Seventh Street
City:	Berkeley
State/Country:	CALIFORNIA
Postal Code:	94710
PROPERTY NUMBERS Total: 1	
Property Type	Number
Application Number:	60794011
CORRESPONDENCE DATA	
Fax Number:	(919)862-2260
<i>Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.</i>	
Phone:	9198622229
Email:	polly.burton@alston.com
Correspondent Name:	Leslie T. Henry
Address Line 1:	3201 Beechleaf Court, Suite 600
Address Line 4:	Raleigh, NORTH CAROLINA 27604-1062
ATTORNEY DOCKET NUMBER:	035784/308499
NAME OF SUBMITTER:	Leslie T. Henry
Total Attachments: 4 source=308499NovartisAGtoXomaAssignment#page1.tif source=308499NovartisAGtoXomaAssignment#page2.tif source=308499NovartisAGtoXomaAssignment#page3.tif source=308499NovartisAGtoXomaAssignment#page4.tif	

CH \$40.00 60794011

ASSIGNMENT

THIS ASSIGNMENT, effective April 22, 2006, made by **NOVARTIS AG**, a corporation of Switzerland, having a principal place of business at Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel, Switzerland,

WITNESSETH: That,

WHEREAS, **NOVARTIS AG**, hereinafter referred to as **ASSIGNOR**, has previously acquired all right, title, and interest in and to certain new and useful improvements in **ANTAGONIST ANTI-CD40 ANTIBODY PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS** for which a PROVISIONAL application has been filed in the United States Patent and Trademark Office on April 21, 2006, and bears Application No. 60/794,011, and

WHEREAS, **XOMA TECHNOLOGY LTD.**, a corporation of Bermuda, having its principal place of business at 2910 Seventh Street, Berkeley, CA 94710, hereinafter referred to as **ASSIGNEE**, is desirous of acquiring fifty percent (50%) of the rights, title, and interest in and to said invention as described in said application, and in and to any and all Letters Patent which shall be granted therefor in the United States of America and all foreign countries; and

WHEREAS, the parties have agreed to the Assignment hereinafter set forth;

NOW, THEREFORE, To All Whom It May Concern, be it known that for good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, the above **ASSIGNOR** has sold and by these presents does hereby sell, assign, transfer, and convey unto the said **ASSIGNEE**, its successors and assigns, a fifty percent (50%) right, title, and undivided interest in and to said subject application and said Patents, and the inventions represented thereby, and any and all continuations, continuations-in-part, divisions, or non-provisionals claiming priority thereof, and any and all Letters Patent or reissues, reexaminations, or extensions thereof which may be granted therefor or thereon, for the full end of the term for which said Letters Patent may be granted, together with the right to claim priority in all foreign countries in accordance with the International Convention; a fifty percent (50%) undivided interest in rights corresponding to said Patents in foreign countries throughout the world; and a fifty percent (50%) undivided interest in rights to sue for past infringement of said Patents worldwide, together with all claims for damage by reason of past infringement of said Patents, with the right to sue for, and collect the same for **ASSIGNEE'S**

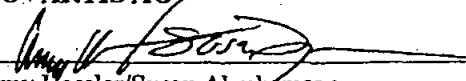
own use and enjoyment; all to be held and enjoyed by said *ASSIGNEE*, its successors and assigns, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by *ASSIGNOR* if this assignment and sale had not been made.

From time to time after the date hereof, at the request of either party hereto, and at the expense of the party so requesting, each of the parties hereto shall execute and deliver to such requesting party such documents and take such other action as such requesting party may reasonably request in order to consummate more effectively the transactions contemplated hereby.

ASSIGNOR further covenants and agrees that, at the time of the execution and delivery of these presents, it possesses full title to the inventions and Patents thereon as earlier identified, and that it has the unencumbered right and authority to make this assignment.

IN WITNESS WHEREOF, *ASSIGNOR* and *ASSIGNEE* have hereunto signed this assignment on the dates indicated below.

NOVARTIS AG

By: 

Amy Hessler/Susan Abrahamson
Authorized Representatives

XOMA TECHNOLOGY LTD.

By: 

Anne Dollard

(Print Name of Person Signing)

Its: _____

Assistant Secretary

(Print Title of Person Signing)

AttyDktNo. PP028228.0001 (035784/308499)

#2168961

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of Alameda

ss.

On May 9, 2007

before me, Elissa M. Nash

Date

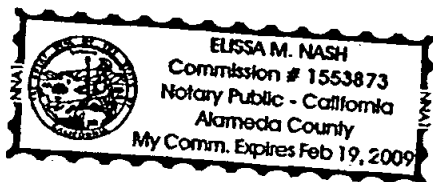
Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")

personally appeared Amy Hessler and Susan Abrahamson

Name(s) of Signer(s)

- ☒ personally known to me
☐ proved to me on the basis of satisfactory evidence

to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.



WITNESS my hand and official seal.

Elissa M. Nash
 Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: Assignment

Document Date: ~~May 9, 2007~~ April 22, 2006 Number of Pages: _____

Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: Amy Hessler and Susan Abrahamson

- ☐ Individual
☒ Corporate Officer — Title(s): Authorized Representatives
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney-in-Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

Signer Is Representing: Novartis AG

RIGHT THUMBPRINT
 OF SIGNER
 Top of thumb here

00049

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

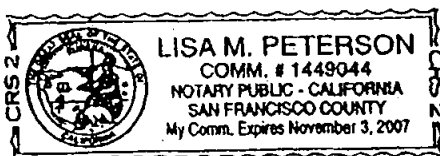
County of Alameda } ss.

On May 9, 2007, before me Lisa M. Peterson Notary Public
Date Name and Title of Officer (e.g., Jane Doe, Notary Public)

personally appeared Anne Dollard
Name(s) of Signer(s)

☒ personally known to me
☐ proved to me on the basis of satisfactory evidence

to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.



Place Notary Seal Above

WITNESS my hand and official seal.

[Signature]
Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: Assignment

Document Date: May 9, 2007 Number of Pages: two

Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____

☐ Individual

☒ Corporate Officer — Title(s): Assistant Secretary

☐ Partner — ☐ Limited ☐ General

☐ Attorney in Fact

☐ Trustee

☐ Guardian or Conservator

☐ Other: _____

Signer Is Representing: XOMA Technology Ltd.

RIGHT THUMBPRINT
OF SIGNER

Top of thumb here

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
1 November 2007 (01.11.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/124299 A2

(51) International Patent Classification: Not classified

(21) International Application Number:
PCT/US2007/066757

(22) International Filing Date: 17 April 2007 (17.04.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/794,011 21 April 2006 (21.04.2006) US

(71) Applicants (for all designated States except US): **NOVARTIS AG** [CH/CH]; Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel (CH). **XOMA TECHNOLOGY LTD.** [US/US]; 2910 Seventh Street, Berkley, CA 94701 (US);

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **LU, Xiaofeng** [CN/US]; Novartis Vaccines And Diagnostics, Inc., P.o.box 8097, Emeryville, CA 94662-8097 (US). **CHEN, Bao-Lu** [US/US]; Novartis Vaccines And Diagnostics, Inc., P.o.box 8097, Emeryville, CA 94662-8097 (US). **ARAYA, Kidisti** [US/US]; Novartis Vaccines And Diagnostics, Inc., P.o. Box 8097, Emeryville, CA 94662-8097 (US). **OKHAMAFE, Augustus** [US/US]; Novartis Vaccines And Diagnostics, Inc., P.o. Box 8097, Emeryville, CA 94662-8097 (US).

(74) Agents: **HERNRY, Leslie, T. et al.; ALSTON & BIRD LLP**, Bank Of America Plaza, 101 South Tryon Street, Suite 4000, Charlotte, NC 28280-4000 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

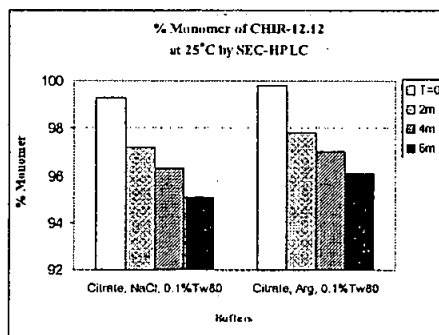
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, 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
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

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.

(54) Title: ANTAGONIST ANTI-CD40 ANTIBODY PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS



(57) Abstract: Stable liquid pharmaceutical compositions comprising an antagonist anti- CD40 antibody as a therapeutically or prophylactically active component and methods useful in their preparation are provided. These compositions comprise the antagonist anti-CD40 antibody, a buffering agent to maintain the pH of the composition between about pH 5.0 and about pH 7.0, and an amount of arginine-HCl sufficient to render the liquid composition near isotonic. The stable liquid antagonist anti-CD40 antibody-containing pharmaceutical compositions of the invention find use in methods for treating proliferative diseases and diseases having an autoimmune and/or inflammatory component.

WO 2007/124299 A2

ANTAGONIST ANTI-CD40 ANTIBODY PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

FIELD OF THE INVENTION

The present invention is directed to the field of pharmaceutical formulations, more particularly to stable liquid pharmaceutical compositions comprising antagonist anti-CD40 antibodies for use in treating proliferative diseases and diseases having an autoimmune or inflammatory component.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Recent advances in the development of genetic engineering technology have provided a variety of biologically active polypeptides in sufficiently large quantities for use as drugs. Polypeptides, however, can lose biological activity as a result of physical instabilities, including denaturation and formation of soluble and insoluble aggregates, and a variety of chemical instabilities, such as hydrolysis, oxidation, and deamidation. Stability of polypeptides in liquid pharmaceutical formulations can be affected, for example, by factors such as pH, ionic strength, temperature, repeated cycles of freeze-thaw, and exposure to mechanical shear forces such as occur during processing. Aggregate formation and loss of biological activity can also occur as a result of physical agitation and interactions of polypeptide molecules in solution and at the liquid-air interfaces within storage vials. Further conformational changes may occur in polypeptides adsorbed to air-liquid and solid-liquid interfaces during compression-extension of the interfaces resulting from agitation during transportation or otherwise. Such agitation can cause the protein to entangle, aggregate, form particles, and ultimately precipitate with other adsorbed proteins. For a general review of stability of protein pharmaceuticals, see, for example, Manning *et al.* (1989) *Pharm. Res.* 6:903-918, and Wang and Hanson (1988) *J. Parenteral Sci. Tech.* 42:S14.

Instability of polypeptide-containing liquid pharmaceutical formulations has prompted packaging of these formulations in the lyophilized form along with a suitable liquid medium for reconstitution. Although lyophilization improves storage stability of the composition, many polypeptides exhibit decreased activity, either during storage in the dried state (Pikal (1990) *Biopharm.* 27:26-30) or as a result of aggregate formation or loss of catalytic activity upon reconstitution as a liquid formulation (see, for example, Carpenter *et al.* (1991) *Develop. Biol. Standard* 74:225-239; Broadhead *et al.* (1992) *Drug Devel. Ind. Pharm.* 18:1169-1206; Mumenthaler *et al.* (1994) *Pharm. Res.* 11:12-20; Carpenter and Crowe (1988) *Cryobiology* 25:459-470; and Roser (1991) *Biopharm.* 4:47-53). While the use of additives has improved the stability of dried proteins, many rehydrated formulations continue to have unacceptable or undesirable amounts of inactive, aggregated protein (see, for example, Townsend and DeLuca (1983) *J. Pharm. Sci.* 80:63-66; Hora *et al.* (1992) *Pharm. Res.* 9:33-36; Yoshioka *et al.* (1993) *Pharm. Res.* 10:687-691). Also, the need for reconstitution is an inconvenience and introduces the possibility of incorrect dosing.

Included in the pharmaceutically useful polypeptides are recombinantly produced monoclonal antibodies. Among this class of therapeutic agents, the antagonist anti-CD40 antibodies targeting the TNF family receptor member CD40 hold great promise for the treatment of B-cell related malignancies and non-hematological malignancies, as well as diseases having an autoimmune and/or inflammatory component. The CD40 receptor is a 50-55 kDa cell-surface antigen present on the surface of both normal and neoplastic human B cells, dendritic cells, monocytes, macrophages, CD8⁺ T cells, endothelial cells, monocytic and epithelial cells, some epithelial carcinomas, and many solid tumors, including lung, breast, ovary, urinary bladder, and colon cancers. The CD40 antigen is also expressed on activated T cells, activated platelets, inflamed vascular smooth muscle cells, eosinophils, synovial membranes in rheumatoid arthritis, dermal fibroblasts, and other non-lymphoid cell types. Depending on the type of cell expressing CD40, ligation can induce intercellular adhesion, differentiation, activation, and proliferation.

For example, binding of CD40 to its cognate ligand, CD40L (also designated CD154), stimulates B-cell proliferation and differentiation into plasma cells, antibody production, isotype switching, and B-cell memory generation. During B-cell

differentiation, CD40 is expressed on pre-B cells but lost upon differentiation into plasma cells. CD40 expression on APCs plays an important co-stimulatory role in the activation of these cells. For example, agonistic anti-CD40 monoclonal antibodies (mAbs) have been shown to mimic the effects of T helper cells in B-cell activation.

5 When presented on adherent cells expressing FcγRII, these antibodies induce B-cell proliferation (Banchereau *et al.* (1989) *Science* 251:70). Moreover, agonistic anti-CD40 mAbs can replace the T helper signal for secretion of IgM, IgG, and IgE in the presence of IL-4 (Gascan *et al.* (1991) *J. Immunol.* 147:8). Furthermore, agonistic anti-CD40 mAbs can prevent programmed cell death (apoptosis) of B cells isolated
10 from lymph nodes.

These and other observations support the current theory that the interaction of CD40 and CD40L plays a pivotal role in regulating both humoral and cell-mediated immune responses. More recent studies have revealed a much broader role of CD40/CD40L interaction in diverse physiological and pathological processes.

15 Thus, CD40 engagement by CD40L and subsequent activation of CD40 signaling are necessary steps for normal immune responses; however, dysregulation of CD40 signaling can lead to disease. The CD40 signaling pathway has been shown to be involved in autoimmune disease (Ichikawa *et al.* (2002) *J. Immunol.* 169:2781-2787 and Moore *et al.* (2002) *J. Autoimmun.* 19:139-145). Additionally, the
20 CD40/CD40L interaction plays an important role in inflammatory processes. For example, both CD40 and CD40L are overexpressed in human and experimental atherosclerosis lesions. CD40 stimulation induces expression of matrix-degrading enzymes and tissue factor expression in atheroma-associated cell types, such as endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages. Further, CD40 stimulation
25 induces production of proinflammatory cytokines such as IL-1, IL-6, and IL-8, and adhesion molecules such as ICAM-1, E-selectin, and VCAM. Inhibition of CD40/CD40L interaction prevents atherogenesis in animal models. In transplant models, blocking CD40/CD40L interaction prevents inflammation. It has been shown that CD40/CD40L binding acts synergistically with the Alzheimer amyloid-beta
30 peptide to promote microglial activation, thus leading to neurotoxicity. In patients with rheumatoid arthritis (RA), CD40 expression is increased on articular chondrocytes, thus, CD40 signaling likely contributes to production of damaging

cytokines and matrix metalloproteinases. See, Gotoh *et al.* (2004) *J. Rheumatol.* 31:1506-1512.

Similarly, malignant B cells from tumor types of B-cell lineage express CD40 and appear to depend on CD40 signaling for survival and proliferation. Transformed
5 cells from patients with low- and high-grade B-cell lymphomas, B-cell acute lymphoblastic leukemia, multiple myeloma, chronic lymphocytic leukemia, Walsdenstrom's Macroglobulinemia, 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.

10 A number of carcinomas and sarcomas also exhibit high levels of CD40 expression, though the role of CD40 signaling in relation to CD40 expression on these cancer cells is less well understood. CD40-expressing carcinomas include urinary bladder carcinoma (Paulie *et al.* (1989) *J. Immunol.* 142:590-595; Braesch-Andersen
15 *et al.* (1989) *J. Immunol.* 142:562-567), breast carcinoma (Hirano *et al.* (1999) *Blood* 93:2999-3007; Wingett *et al.* (1998) *Breast Cancer Res. Treat.* 50:27-36); prostate cancer (Rokhlin *et al.* (1997) *Cancer Res.* 57:1758-1768), renal cell carcinoma (Kluth
20 *et al.* (1997) *Cancer Res.* 57:891-899), undifferentiated nasopharyngeal carcinoma (UNPC) (Agathangelou *et al.* (1995) *Am. J. Pathol.* 147:1152-1160), squamous cell carcinoma (SCC) (Amo *et al.* (2000) *Eur. J. Dermatol.* 10:438-442; Posner *et al.*
(1999) *Clin. Cancer Res.* 5:2261-2270), thyroid papillary carcinoma (Smith *et al.* (1999) *Thyroid* 9:749-755), cutaneous malignant melanoma (van den Oord *et al.* (1996) *Am. J. Pathol.* 149:1953-1961), gastric carcinoma (Yamaguchi *et al.* (2003) *Int. J. Oncol.* 23(6):1697-702), and liver carcinoma (see, for example, Sugimoto *et al.* (1999) *Hepatology* 30(4):920-26, discussing human hepatocellular carcinoma). For
25 CD40-expressing sarcomas, see, for example, Lollini *et al.* (1998) *Clin. Cancer Res.* 4(8):1843-849, discussing human osteosarcoma and Ewing's sarcoma.

Given the potential therapeutic benefits of antagonist anti-CD40 antibodies in regulating CD40L-mediated CD40 signaling in various cancer and
autoimmune/inflammatory diseases, and the challenges of formulating these
30 polypeptides, stable pharmaceutical compositions comprising these antibodies are needed.

00055

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

Stable liquid pharmaceutical compositions comprising an antagonist anti-CD40 antibody as a therapeutically or prophylactically active component and methods useful in their preparation are provided. These compositions comprise the antagonist anti-CD40 antibody, a buffering agent to maintain the pH of the composition between about pH 5.0 and about pH 7.0, and an amount of arginine-HCl sufficient to render the liquid composition near isotonic. In some embodiments, the buffering agent is a citrate/citric acid buffer, the antagonist anti-CD40 antibody is the CHIR-12.12 or CHIR-5.9 antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof, the composition comprises arginine-HCl as the isotonicizing agent, and the composition further comprises a nonionic surfactant and/or L-methionine as further stabilizing agents. The stable liquid antagonist anti-CD40 antibody-containing pharmaceutical compositions of the invention find use in methods for treating proliferative diseases and diseases having an autoimmune and/or inflammatory component.

BRIEF DESCRIPTION OF THE SEVERAL VIEWS OF THE DRAWING(S)

Figure 1 shows the effect of buffer species on purity of mAb CHIR-12.12 formulations stored at 25°C for 3 months or 5 months as measured by SEC-HPLC analysis.

Figure 2 shows the effect of buffer species on aggregate formation of mAb CHIR-12.12 within the various antibody formulations stored at 25°C for 3 months or 5 months, as measured by SEC-HPLC analysis.

Figure 3 shows the effect of buffer species on fragmentation of mAb CHIR-12.12 within the various antibody formulations stored at 25°C for 3 months or 5 months, as measured by SEC-HPLC analysis.

Figure 4 shows the effect of buffer species on purity of mAb CHIR-12.12 formulations stored at 40°C for 3 months or 5 months as measured by SEC-HPLC analysis.

Figure 5 shows the effect of buffer species on aggregate formation of mAb CHIR-12.12 within the various antibody formulations stored at 40°C for 3 months or 5 months, as measured by SEC-HPLC analysis.

Figure 6 shows the effect of buffer species on fragmentation of mAb CHIR-12.12 within the various antibody formulations stored at 40°C for 3 months or 5 months, as measured by SEC-HPLC analysis.

Figure 7 shows differential scanning calorimetry thermograms for mAb CHIR-12.12 in the formulations containing either NaCl or L-arginine-HCl as the isotonicizing agent.

Figure 8 shows % monomer form of mAb CHIR-12.12 remaining in formulations containing either NaCl or L-arginine-HCl as the isotonicizing agent when stored at 25°C for 2, 4, or 6 months, as measured by SEC-HPLC.

Figure 9 shows % aggregates of mAb CHIR-12.12 in formulations containing either NaCl or L-arginine-HCl as the isotonicizing agent when stored at 25°C for 2, 4, or 6 months, as measured by SEC-HPLC.

Figure 10 shows % fragments of mAb CHIR-12.12 in formulations containing either NaCl or L-arginine-HCl as the isotonicizing agent when stored at 25°C for 2, 4, or 6 months, as measured by SEC-HPLC.

Figure 11 shows % monomer form of mAb CHIR-12.12 remaining in formulations containing either NaCl or L-arginine-HCl as the isotonicizing agent when stored at 40°C for 2 or 4 months, as measured by SEC-HPLC.

Figure 12 shows % aggregates of mAb CHIR-12.12 in formulations containing either NaCl or L-arginine-HCl as the isotonicizing agent when stored at 40°C for 2 or 4 months, as measured by SEC-HPLC.

Figure 13 shows % fragments of mAb CHIR-12.12 in formulations containing either NaCl or L-arginine-HCl as the isotonicizing agent when stored at 40°C for 2 or 4 months, as measured by SEC-HPLC.

Figure 14 shows % purity of mAb CHIR-12.12 in formulations containing either NaCl or L-arginine-HCl as the isotonicizing agent when stored at 25°C for 2, 4, or 6 months, as measured by CIEC-HPLC.

Figure 15 shows % acidic variants of mAb CHIR-12.12 in formulations containing either NaCl or L-arginine-HCl as the isotonicizing agent when stored at 25°C for 2, 4, or 6 months, as measured by CIEC-HPLC.

Figure 16 shows % basic variants of mAb CHIR-12.12 in formulations containing either NaCl or L-arginine-HCl as the isotonicizing agent when stored at 25°C for 2, 4, or 6 months, as measured by CIEC-HPLC.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present inventions now will be described more fully hereinafter with reference to the accompanying drawings, in which some, but not all embodiments of the inventions are shown. Indeed, these inventions may be embodied in many different forms and should not be construed as limited to the embodiments set forth herein; rather, these embodiments are provided so that this disclosure will satisfy applicable legal requirements.

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

The present invention is directed to stable liquid pharmaceutical compositions comprising at least one antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof as a therapeutically or prophylactically active component, and to methods useful in their preparation. For purposes of the present invention, the term "liquid" with regard to pharmaceutical compositions or formulations is intended to include the term "aqueous." By "therapeutically or prophylactically active component" is intended the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof 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.

By "stable" is intended the pharmaceutical compositions of the invention provide for the physical and/or chemical stability of the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof. That is, the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof essentially retains its physical and/or chemical stability and has the desired biological activity, i.e., one or more of the antagonist activities defined elsewhere herein, 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; inhibition of proliferation of human malignant B cells; deletion, anergy and/or tolerance induction of CD40-bearing target cells or cells bearing cognate ligands to CD40 including, but not limited to, T cells and B cells; induction of expansion or activation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (see for example, donor alloantigen-specific tissue rejection via CD40-CD40L interference, van Maurik *et al.* (2002) *J. Immunol.* 169:5401-5404); cytotoxicity via any mechanism (including, but not limited to, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), complement-dependent cytotoxicity (CDC), down-regulation of proliferation, and/or apoptosis in target cells); modulation of target cell cytokine secretion and/or cell surface molecule expression; and combinations thereof.

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 composition 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 provisional applications entitled "*Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use*," filed November 4, 2003, November 26, 2003, and April 27, 2004, and assigned U.S. Patent Application Nos. 60/517,337 (Attorney Docket No. PP20107.001 (035784/258442)), 60/525,579 (Attorney Docket No. PP20107.002 (035784/271525)), and 60/565,710 (Attorney Docket No. PP20107.003 (035784/277214)), respectively; and International Patent Application No. PCT/US2004/037152 (Attorney Docket No. PP20107.004 (035784/282916)), also entitled "*Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use*," filed November 4, 2004, and published as WO 2005/044854; the contents of each of which are herein incorporated by reference in their entirety. See also the assays described in provisional application entitled "*Methods for Diagnosis and Treatment of Proliferative Disorders Mediated by CD40 Signaling*," filed December 9, 2005, and assigned U.S. Patent Application No. 60/749,285 (Attorney Docket No. PP028035.0002 (035784/304312)), and corresponding International Patent Application No. PCT/US2006/019414 (Attorney Docket No. PP028035.0003

no. 60

(035784/311611)), filed May 18, 2006, and published as WO 2006/125143; and provisional application entitled "*Methods for Diagnosis and Treatment of Diseases Having an Autoimmune and/or Inflammatory Component*," filed December 9, 2005, and assigned U.S. Patent Application No. 60/749,336 (Attorney Docket No. PP028062.0002 (035784/304311)), and corresponding International Patent Application No. PCT/US2006/019325 (Attorney Docket No. PP028062.0003 (035784/311608)), filed May 18, 2006, and published as WO 2006/125117; the contents of each of which are herein incorporated by reference in their entirety. Also see 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.

The antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof that is to be formulated in accordance with the methods of the present invention can be prepared using any method known in the art, including those methods disclosed elsewhere herein. 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 as described herein below.

Following its preparation and purification, the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof can be formulated as a liquid pharmaceutical composition 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, for example, at $\leq -20^{\circ}\text{C}$, and then thawed at room temperature for further formulation.

The liquid pharmaceutical compositions of the invention comprise a therapeutically or prophylactically 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 compositions of the present invention comprise 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 35.0 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, about 10.0 mg/ml to about 35.0 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, about 25.0 mg/ml, about 26.0 mg/ml, about 27.0 mg/ml, about 28.0 mg/ml, about 29.0 mg/ml, about 30.0 mg/ml, about 31.0 mg/ml, about 32.0 mg/ml, about 33.0 mg/ml, about 34.0 mg/ml, or about 35.0 mg/ml.

In accordance with the present invention, the antagonist anti-CD40 antibody, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9 described herein below, or antigen-binding fragment thereof, is formulated with a buffer that maintains the pH of the pharmaceutical composition in the range of about pH 5.0 to about pH 7.0, and an amount of arginine in its acidic form, referred to herein as arginine-HCl, sufficient to render the composition near isotonic. By "near isotonic" is intended the aqueous formulation has an osmolality 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. In some embodiments, the liquid pharmaceutical composition has an osmolality of about 295 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.

The arginine-HCl not only serves as an isotonizing agent, but also serves to stabilize the antibody against conformational changes, aggregate formation, fragmentation, and/or deamidation during storage of the liquid pharmaceutical compositions of the invention. By "during storage" is intended a liquid pharmaceutical composition or formulation once prepared, is not immediately administered to a subject. Rather, following preparation, it is packaged for storage, either in a liquid form, in a frozen state, or in a dried form for later reconstitution into a liquid form or other form suitable for administration to a subject. By "dried form" is intended the liquid pharmaceutical composition or formulation is dried either by freeze drying (i.e., lyophilization; see, for example, Williams and Polli (1984) *J. Parenteral Sci. Technol.* 38:48-59), spray drying (see Masters (1991) in *Spray-Drying Handbook* (5th ed; Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.), pp. 491-676; Broadhead *et al.* (1992) *Drug Devel. Ind. Pharm.* 18:1169-1206; and Mumenthaler *et al.* (1994) *Pharm. Res.* 11:12-20), or air drying (Carpenter and Crowe (1988) *Cryobiology* 25:459-470; and Roser (1991) *Biopharm.* 4:47-53). Conformational changes, aggregate formation, fragmentation, and/or deamidation of an antibody during storage of a liquid pharmaceutical composition can adversely affect biological activity of the antibody, resulting in loss of therapeutic efficacy of the pharmaceutical composition. Furthermore, aggregate formation may cause other problems such as blockage of tubing, membranes, or pumps when the antibody-containing pharmaceutical composition is administered using an infusion system.

Any stereoisomer (i.e., L, D, or DL isomer) of arginine, or combinations of these stereoisomers, may be present in the pharmaceutical compositions of the invention so long as the arginine is present in its acidic form, i.e., arginine-HCl. Preferably the L-stereoisomer is used. Compositions of the invention may also be formulated with analogues of this amino acid. By "amino acid analogue" is intended a derivative of the naturally occurring amino acid that brings about the desired effect of rendering the composition near isotonic as well as decreasing aggregate formation, fragmentation, and/or deamidation of the polypeptide during storage of the liquid pharmaceutical compositions of the invention. Suitable arginine analogues include,

for example, aminoguanidine and N-monoethyl L-arginine. As with the arginine, the amino acid analogues are incorporated into the compositions in their acidic form.

The concentration of arginine-HCl in the pharmaceutical composition will depend upon the contribution of other components to tonicity. In some embodiments, the concentration of arginine-HCl 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 arginine-HCl is about 125 mM, about 150 mM, or about 175 mM.

The pH of a liquid antibody-containing pharmaceutical composition affects the stability of the antibody contained therein, primarily through its affect on polypeptide aggregate formation. Thus the amount of buffering agent present in the pharmaceutical compositions of the invention will vary depending upon the pH optimum for stability of a particular antagonist anti-CD40 antibody of interest. Determination of this pH optimum can be achieved using methods generally available in the art, including, for example, Differential Scanning Calorimetry (DSC), which assesses conformational stability; SDS-PAGE and size-exclusion chromatography (SEC-HPLC), which assess aggregation and fragmentation; and Cation-Exchange HPLC (CIEX-HPLC) analysis, which assesses charge change-related degradation. Preferred pH for the liquid pharmaceutical compositions of the invention is 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 buffering agent maintains the pH of the pharmaceutical composition 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 buffering agent that maintains the pH of the liquid antagonist anti-CD40 antibody pharmaceutical composition 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 buffering agents 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 liquid pharmaceutical composition include, but are not limited to, citric acid or citrate, succinic acid or succinate, 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. It is recognized that the buffering agent can be a mixture of the acid and the salt form of the acid, for example, a mixture of citric acid and citrate (referred to herein as a citrate/citric acid buffer), a mixture of succinic acid and succinate (referred to herein as a succinate/succinic acid buffer), a mixture of acetic acid and acetate (referred to herein as an acetate/acetic acid buffer), and the like for each of the foregoing acid/salt pairs. The concentration of the buffering agent 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 concentration of the buffering agent 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 composition comprises the desired concentration (i.e., about 0.1 mg/ml to about 50.0 mg/ml as noted above) of an antagonist anti-CD40 antibody described elsewhere herein, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding fragment thereof, an amount of arginine-HCl to render the composition near isotonic, and a buffering agent that is a citrate/citric acid buffer, where the concentration of the buffering agent is such that the buffering agent maintains the pH of the pharmaceutical composition in the range of about pH 5.0 to about pH 7.0, preferably about pH 5.0 to about pH 6.5, including about pH 5.0, 5.5, 6.0, and 6.5. By "citrate" is intended a buffer comprising a salt of citric acid. In a preferred embodiment, the citrate counterion is the sodium cation, and thus the citrate buffer component is sodium citrate. However, any cation is expected to be effective. Other possible citrate cations include, but are not limited to, potassium, ammonium, calcium, and

magnesium. As noted above, a citrate/citric acid buffer comprises a mixture of the acid (i.e., citric acid) and the salt form of the acid (i.e., citrate), where the counterion in the salt form of the acid can be any suitable cation. In one such embodiment, the counter ion for the salt form of the acid is the sodium cation, and hence the buffering agent comprises a mixture of citric acid and sodium citrate. As noted above, the concentration of the citrate/citric acid buffer 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 citrate/citric acid buffer concentration 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 composition comprises an antagonist anti-CD40 antibody such as the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding fragment thereof, at a concentration of about 0.1 mg/ml to about 50.0 mg/ml, about 5.0 mg/ml to about 35.0 mg/ml, about 10.0 mg/ml to about 35.0 mg/ml, or about 10.0 mg/ml to about 20.0 mg/ml; an amount of arginine-HCl to render the composition near isotonic; and the buffering agent is a citrate/citric acid buffer at a concentration of about 1 mM to about 20 mM, about 5 mM to about 15 mM, preferably about 10 mM. In yet other embodiments, the liquid pharmaceutical composition comprises an antagonist anti-CD40 antibody such as the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding fragment thereof, at a concentration of about 0.1 mg/ml to about 50.0 mg/ml, about 5.0 mg/ml to about 35.0 mg/ml, about 10.0 mg/ml to about 35.0 mg/ml, or about 10.0 mg/ml to about 20.0 mg/ml; an amount of arginine-HCl to render the composition near isotonic; and the buffering agent is sodium citrate/citric acid buffer at a concentration of about 1 mM to about 20 mM, about 5 mM to about 15 mM, preferably about 10 mM.

In some preferred embodiments, the liquid pharmaceutical composition comprises the antagonist anti-CD40 antibody, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding fragment thereof; a buffering agent to maintain the pH of the pharmaceutical composition within the range of about pH 5.0 to about pH 7.0; and the concentration of arginine-HCl is about 100 mM to about 200 mM. In some of these embodiments, the buffering agent is sodium citrate/citric acid buffer at a concentration of about 5 mM to about 15 mM, the liquid pharmaceutical

composition comprises the antagonist anti-CD40 antibody, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding fragment thereof, and the pharmaceutical composition has a pH of about pH 5.0 to about pH 7.0, about pH 5.0 to about pH 6.5, or about pH 5.5 to about pH 6.0. In other embodiments, the liquid pharmaceutical composition comprises the antagonist anti-CD40 antibody, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding fragment thereof, at a concentration of about 0.1 mg/ml to about 50.0 mg/ml, about 5.0 mg/ml to about 35.0 mg/ml, or about 10.0 mg/ml to about 35.0 mg/ml, including about 10.0 mg/ml, about 15.0 mg/ml, about 20.0 mg/ml, about 25.0 mg/ml, about 30.0 mg/ml, or about 35.0 mg/ml; about 150 mM arginine-HCl; and the buffering agent is about 10 mM sodium citrate/citric acid buffer; where the formulation has a pH of about pH 5.5.

Protein degradation due to freeze thawing or mechanical shearing during processing of 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 composition comprises an antagonist anti-CD40 antibody, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding fragment thereof; a buffering agent to maintain the pH of the pharmaceutical composition within the range of about pH 5.0 to about pH 7.0; an amount of arginine-HCl to render the liquid pharmaceutical composition near isotonic; and further comprises a surfactant. In other embodiments, the liquid pharmaceutical composition comprises an antagonist anti-CD40 antibody, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding fragment thereof; a buffering agent to maintain the pH of the pharmaceutical composition within the range of about pH 5.0 to about pH 7.0; arginine-HCl at a concentration of about 50 mM to about 300 mM, or about 100 mM to about 200 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 20 or polysorbate 80. Where a surfactant is included, it is typically added in an amount from about 0.001 % to about 1.0%, 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%, where percentages are on a weight/volume (w/v) basis.

Thus, in some embodiments, the liquid pharmaceutical composition comprises an antagonist anti-CD40 antibody, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding fragment thereof; the buffering agent is a citrate/citric acid buffer, for example, sodium citrate/citric acid 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 composition has a pH of about pH 5.0 to about pH 7.0, about pH 5.0 to about pH 6.5, or about pH 5.5 to about pH 6.0; arginine-HCl is present at a concentration of about 50 mM to about 300 mM, about 100 mM to about 200 mM, or about 50 mM to about 150 mM; and the pharmaceutical composition further comprises a surfactant, for example, polysorbate 20, in an amount from about 0.001% to about 1.0% (w/v) or about 0.001% to about 0.5% (w/v). In other embodiments, the liquid pharmaceutical composition comprises an antagonist anti-CD40 antibody, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding fragment thereof, at a concentration of about 0.1 mg/ml to about 50.0 mg/ml, about 5.0 mg/ml to about 35.0 mg/ml, or about 10.0 mg/ml to about 35.0 mg/ml, including about 10.0 mg/ml, about 15.0 mg/ml, about 20.0 mg/ml, about 25.0 mg/ml, about 30.0 mg/ml, or about 35.0 mg/ml; about 50 mM to about 200 mM arginine-HCl, including about 150 mM arginine-HCl; the buffering agent is sodium citrate/citric acid buffer at a concentration of about 5 mM to about 20 mM, including about 10 mM; and the pharmaceutical composition optionally comprises a surfactant, for example, polysorbate 20, in an amount from about 0.001% to about 1.0% (w/v), including about 0.001% to about 0.5% (w/v), about 0.01% to about 0.25% (w/v), about 0.025% to about 0.2% (w/v), about 0.025% to about 0.1% (w/v), or about 0.05% to about 0.2% (w/v); where the liquid pharmaceutical composition has a pH of

00008

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, about pH 5.5 to about pH 6.0, or about pH 5.5.

The liquid pharmaceutical composition can be essentially free of any preservatives and other carriers, excipients, or stabilizers. Alternatively, the pharmaceutical composition can optionally include one or more preservatives, for example, antibacterial agents, pharmaceutically acceptable carriers, excipients, or stabilizers described elsewhere herein provided they do not adversely affect the physicochemical stability of the 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.

Thus, in one embodiment, the antagonist anti-CD40 antibody-containing liquid pharmaceutical compositions of the invention further comprise the amino acid methionine to inhibit oxidation of oxidizable amino acid residues within the antibody polypeptide chains. By "inhibit" is intended minimal accumulation of oxidized species over time. Inhibiting oxidation results in greater retention of the antagonist anti-CD40 antibody in its proper molecular form. Any stereoisomer of methionine (L, D, or DL isomer) or combinations thereof can be used. The amount to be added should be an amount sufficient to inhibit oxidation of the oxidizable amino acid residues such that the amount of oxidized species is acceptable to regulatory agencies. Typically, this means that the composition contains no more than about 10% to about 30% oxidation products. Generally, this can be achieved by adding methionine such that the ratio of methionine added to methionine residues ranges from about 1:1 to about 1000:1, most preferably 10:1 to about 100:1.

The preferred amount of methionine to be added can readily be determined empirically by preparing the composition comprising the antagonist anti-CD40 antibody of interest, or antigen-binding fragment thereof, with different concentrations of methionine and determining the relative effect on formation of

oxidative species of the polypeptide using, for instance, chromatographic separation of the molecular species and identification using polypeptide molecular weight standards, such as with RP-HPLC, or hydrophobic interaction chromatography (HIC) as described below in Example 1. That concentration of methionine that maximizes inhibition of oxidation of oxidizable amino acid residues, without having adverse affects on amino acid-related inhibition of antibody aggregation, would represent a preferred amount of methionine to be added to the composition to further improve antibody stability.

Thus, in some embodiments of the invention, the liquid pharmaceutical composition comprises an antagonist anti-CD40 antibody, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding fragment thereof; the buffering agent is a citrate/citric acid buffer, for example, sodium citrate/citric acid 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 pharmaceutical composition has a pH of about pH 5.0 to about pH 7.0, about pH 5.0 to about pH 6.5, or about pH 5.5 to about pH 6.0; arginine-HCl is present at a concentration of about 50 mM to about 300 mM, about 100 mM to about 200 mM, or about 50 mM to about 150 mM; a surfactant is present, for example, polysorbate 20 or polysorbate 80, in an amount from about 0.001% to about 1.0% (w/v) or about 0.001% to about 0.5% (w/v); and the pharmaceutical composition further comprises methionine at a concentration of about 0.5 mM to about 20.0 mM, about 0.5 mM to about 10.0 mM, about 1.0 mM to about 20.0 mM, about 1.0 mM to about 10.0 mM, about 1.0 mM to about 7.0 mM, about 2.0 mM to about 6.0 mM, or about 2.5 mM to about 5.0 mM. In other embodiments, the liquid pharmaceutical composition comprises an antagonist anti-CD40 antibody, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding fragment thereof, at a concentration of about 0.1 mg/ml to about 50.0 mg/ml, about 5.0 mg/ml to about 35.0 mg/ml, or about 10.0 mg/ml to about 35.0 mg/ml, including about 10.0 mg/ml, about 15.0 mg/ml, about 20.0 mg/ml, about 25.0 mg/ml, about 30.0 mg/ml, or about 35.0 mg/ml; about 50 mM to about 200 mM arginine-HCl, including about 150 mM arginine-HCl; sodium citrate/citric acid buffer at a concentration of about 5 mM to about 20 mM, including about 10 mM; optionally a surfactant, for example, polysorbate 20, in an amount from about 0.001% to about 1.0% (w/v), including about 0.001% to about 0.5% (w/v), about 0.01% to about 0.25% (w/v),

about 0.025% to about 0.2% (w/v), about 0.025% to about 0.1% (w/v), or about 0.05% to about 0.2% (w/v); and optionally methionine, for example, at a concentration of about 0.5 mM to about 10.0 mM, about 1.0 mM to about 7.0 mM, about 2.0 mM to about 6.0 mM, or about 2.5 mM to about 5.0 mM, including about 2.0 mM, about 2.5 mM, about 3.0 mM, about 3.5 mM, about 4.0 mM, about 4.5 mM, about 5.0 mM, or about 5.5 mM; where the liquid pharmaceutical composition 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, about pH 5.5 to about pH 6.0, or about pH 5.5.

In yet other embodiments, the liquid pharmaceutical composition comprises the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding fragment thereof, at a concentration of about 0.1 mg/ml to about 50.0 mg/ml, about 5.0 mg/ml to about 35.0 mg/ml, or about 10.0 mg/ml to about 35.0 mg/ml, including about 10.0 mg/ml, about 15.0 mg/ml, about 20.0 mg/ml, about 25.0 mg/ml, about 30.0 mg/ml, or about 35.0 mg/ml; about 100 mM to about 200 mM arginine-HCl, including about 150 mM arginine-HCl; sodium citrate/citric acid buffer at a concentration of about 5 mM to about 20 mM, including about 10 mM; optionally a surfactant, for example, polysorbate 20, in an amount from about 0.025% to about 0.1% (w/v); and optionally methionine, for example, at a concentration of about 2.0 mM to about 5.5 mM, including about 5.0 mM; where the liquid pharmaceutical composition has a pH of about pH 5.0 to about pH 6.0, including about pH 5.5.

In addition to those agents disclosed above, other stabilizing agents, such as albumin, ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) or one of its salts such as disodium EDTA, can optionally be added to further enhance the stability of the liquid pharmaceutical compositions. Where desirable, the amount of albumin can be added at concentrations of about 1.0% w/v or less. The EDTA acts as a scavenger of metal ions known to catalyze many oxidation reactions, thus providing an additional stabilizing agent. Where desirable, the amount of EDTA can be added at concentrations of about 0.1 to about 5.0 mM.

Where desirable, sugars or sugar alcohols may also be included in the stabilized liquid antagonist anti-CD40 antibody-containing pharmaceutical compositions of the present invention. Any sugar such as mono-, di-, or polysaccharides, or water-soluble glucans, including for example fructose, glucose,

mannose, sorbose, xylose, maltose, lactose, sucrose, dextran, pullulan, dextrin, cyclodextrin, soluble starch, hydroxyethyl starch and carboxymethylcellulose-Na may be used. Sucrose is the most preferred sugar additive. Sugar alcohol is defined as a C4-C8 hydrocarbon having an -OH group and includes, for example, mannitol, sorbitol, inositol, galacitol, dulcitol, xylitol, and arabitolm with mannitol being the most preferred sugar alcohol additive. The sugars or sugar alcohols mentioned above may be used individually or in combination. There is no fixed limit to the amount used, as long as the sugar or sugar alcohol is soluble in the liquid preparation and does not adversely effect the stabilizing effects achieved using the methods of the invention. Preferably, the sugar or sugar alcohol concentration is between about 1.0 % and about 15.0% (w/v), more preferably between about 2.0% and about 10.0% (w/v).

After the liquid 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.

The liquid antagonist anti-CD40 antibody-containing pharmaceutical compositions of the invention are stable and thus have increased storage stability relative to antagonist anti-CD40 antibody compositions prepared in buffered solutions comprising sodium chloride as the isotonizing agent. Without being bound by theory, it is believed that this increased storage stability is observed in the liquid formulation, whether stored directly in that form for later use, stored in a frozen state and thawed prior to use, or prepared in a dried form, such as a lyophilized, air-dried, or spray-dried form, for later reconstitution into a liquid form or other form prior to use. Preferably, compositions of the invention are stored directly in their liquid form to take full advantage of the convenience of having increased storage stability in the liquid form, ease of administration without reconstitution, and ability to supply the formulation in prefilled, ready-to-use syringes or as multidose preparations if the formulation is compatible with bacteriostatic agents.

The compositions of the invention relate to the discovery that the use of arginine-HCl as an isotonizing agent and a mixture of an acid and its salt form, such as sodium citrate/citric acid, as the buffering agent results in a liquid antagonist anti-CD40 antibody-containing pharmaceutical composition that has increased storage stability relative to a liquid antagonist anti-CD40 antibody-containing pharmaceutical composition prepared with sodium chloride and the respective buffering agent. The increased storage stability of the composition is achieved through the influence of the acidic form of arginine on stability of the therapeutically active antagonist anti-CD40 antibody, more particularly its influence on polypeptide aggregation, fragmentation, and deamidation during storage in liquid formulations. Furthermore, incorporation of arginine-HCl as an isotonizing agent in a liquid antagonist anti-CD40 antibody composition buffered in the manner set forth herein results in liquid pharmaceutical compositions that are near isotonic without having to include additional isotonizing agents, such as sodium chloride.

The acidic form of arginine incorporated into the stable liquid pharmaceutical compositions of the invention protects the therapeutically active antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof against physical and chemical changes, thereby increasing stability of the antibody during storage of the composition. By "increasing stability" is intended that one or more of aggregate formation, fragmentation, and deamidation by the antibody during storage of the liquid pharmaceutical composition is decreased relative to that observed during storage of a liquid pharmaceutical composition comprising the antagonist anti-CD40 antibody and the same formulation components with the exception of the absence of this particular isotonizing and stabilizing agent. The effect of arginine-HCl on antagonist anti-CD40 antibody aggregation during storage in a liquid composition can be readily determined by measuring the change in soluble anti-CD40 antibody in solution over time. Amount of soluble anti-CD40 antibody in solution can be quantified by a number of analytical assays adapted to detection of the antibody of interest. Such assays include, for example, reverse phase (RP)-HPLC, size exclusion (SEC)-HPLC, and UV absorbance. Aggregation can also be monitored using SDS-PAGE. See also the Examples herein below.

In the case of aggregation, an effective amount of arginine-HCl to incorporate within an antagonist anti-CD40 antibody-containing liquid pharmaceutical

composition to obtain the stable pharmaceutical compositions of the invention would be viewed as an amount that resulted in decreased aggregate formation over time, and hence greater retention of soluble antagonist anti-CD40 antibody in solution in its nonaggregated, biologically active molecular form. Thus, for example, where the antagonist anti-CD40 antibody is the CHIR-12.12 monoclonal anti-CD40 antibody described in the Examples below, an effective amount of arginine-HCl for use in preparing a stable composition of the invention would be an amount that resulted in greater retention of the CHIR-12.12 antibody in its monomeric molecular form.

Without being bound by theory, increased storage stability of the stable liquid antagonist anti-CD40 antibody-containing compositions of the invention may also be associated with the inhibitory effects of arginine-HCl on antibody fragmentation and/or deamidation of glutamine and/or asparagine residues within the therapeutically active antibody during storage. The effect of arginine-HCl on antibody fragmentation can readily be determined by monitoring changes in molecular species within the formulation over time, for example, using SDS-PAGE and/or SEC-HPLC analysis; see the Examples herein below. The effect of arginine-HCl on deamidation of the anti-CD40 antibody polypeptide during storage in a liquid composition can readily be determined by monitoring the amount of antagonist anti-CD40 antibody present in its deamidated form over time. Methods for measuring molecular species, i.e., native or deamidated, of a polypeptide present in solution phase are generally known in the art. Such methods include chromatographic separation of the molecular species and identification using polypeptide molecular weight standards, such as with RP-HPLC, or cation exchange chromatography (CIEX-HPLC) as described in the Examples below.

The stable liquid antagonist anti-CD40 antibody-containing pharmaceutical compositions of the invention may contain other compounds that increase the effectiveness or promote the desirable qualities of the antagonist anti-CD40 antibody of interest that serves as a therapeutically active component so long as the primary stabilizing effect achieved with the arginine-HCl is not adversely affected. The composition must be safe for administration via the route that is chosen, it must be sterile, and must retain its desired therapeutic activity.

The pharmaceutical compositions of the present invention can be prepared, for example, by premixing the stabilizing and buffering agents, and any other excipients,

000004

prior to incorporation of the antagonist anti-CD40 antibody of interest. Any additional excipients that may be added to further stabilize the compositions of the present invention must not adversely affect the stabilizing effects of the primary isotonicizing and stabilizing agent, i.e., the arginine-HCl, further in combination with the buffering agent, as used to obtain the novel compositions disclosed herein. Following addition of the arginine-HCl to achieve near isotonicity and increased stability of the antagonist anti-CD40 antibody of interest, pH of the liquid composition is adjusted using the buffering agent, preferably within a range disclosed herein, more preferably to the pH optimum for the antagonist anti-CD40 antibody of interest, for example, a pH between about pH 5.0 and pH 7.0, preferably about pH 5.5, for the monoclonal antibody CHIR-12.12. Although pH can be adjusted following addition of the antagonist anti-CD40 antibody into the composition, preferably it is adjusted prior to addition of this polypeptide, as this can reduce the risk of denaturation the polypeptide. Appropriate mechanical devices are then used for achieving a proper mix of constituents.

Thus, the present invention provides a method for increasing the stability of an antagonist anti-CD40 antibody, or antigen-binding fragment thereof, in a liquid pharmaceutical composition. The method comprises combining the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof with a buffering agent that maintains the pharmaceutical composition at a pH between about pH 5.0 and pH 7.0, and an amount of arginine-HCl sufficient to render the composition near isotonic. In some embodiments, the buffering agent is a citrate/citric acid buffer, the concentration of the buffering agent is about 5 mM to about 50 mM, and the amount of arginine-HCl provides for a concentration of this isotonicizing agent within the composition of between about 50 mM to about 300 mM arginine-HCl. In other embodiments, the antagonist anti-CD40 antibody is the CHIR-12.12 or CHIR-5.9 antibody, or antigen-binding fragment thereof; the buffering agent is about 5 mM to about 25 mM sodium citrate/citric acid buffer; the concentration of arginine-HCl within the composition is about 150 mM, and the composition has a pH of about 5.0, about 5.5, about 6.0, or about 6.5.

The stabilized liquid pharmaceutical composition comprising the antagonist anti-CD40 antibody of interest, for example, an antagonist anti-CD40 antibody such as the CHIR-12.12 or CHIR-5.9 monoclonal antibody, or antigen-binding fragment

00075

thereof should be formulated in a unit dosage and may be in an injectable or infusible form such as solution, suspension, or emulsion. As previously noted, it can be stored frozen or prepared in the dried form, such as a lyophilized powder, which can be reconstituted into the liquid solution, suspension, or emulsion before administration by any of various methods including oral or parenteral routes of administration. Preferably it is stored in the liquid formulation to take advantage of the increased storage stability achieved in accordance with the methods of the present invention as outlined below. The stabilized pharmaceutical composition is preferably sterilized by membrane filtration and is stored in unit-dose or multi-dose containers such as sealed vials or ampules. Additional methods for formulating a pharmaceutical composition generally known in the art may be used to further enhance storage stability of the liquid pharmaceutical compositions disclosed herein provided they do not adversely affect the beneficial effects of the preferred stabilizing and buffering agents disclosed described herein above. A thorough discussion of formulation and selection of pharmaceutically acceptable carriers, stabilizers, etc. can be found in *Remington's Pharmaceutical Sciences* (1990) (18th ed., Mack Pub. Co., Eaton, Pennsylvania), herein incorporated by reference.

In this manner, the present invention provides an article of manufacture comprising a container holding a stable liquid antagonist anti-CD40 antibody-containing pharmaceutical composition of the invention, and optionally comprising instructions for its use. Suitable containers include, for example, vials, bottles, and syringes. The container may be formed from a variety of materials, such as plastic or glass. In one embodiment, the container is a 3-50 cc single-use glass vial. Alternatively, for a ready-to-use formulation, the container may be, for example, a 3-100 cc glass vial. The container holds the formulation and the label on, or associated with, the container may indicate directions for use. The article of manufacture may further include other materials desirable from a commercial and user standpoint, including other buffers, diluents, filters, needles, syringes, and package inserts with instructions for use.

Anti-CD40 Antibodies in the Pharmaceutical Compositions of the Invention

The pharmaceutical compositions of the present invention comprise anti-CD40 antibodies, particularly antagonist anti-CD40 antibodies or antigen-binding fragments

- 2 - 000000

thereof that target the CD40 receptor and which modulate ADCC, interfere with CD40 signaling, particularly CD40 signaling pathways that are mediated by interaction of CD40 with the CD40 ligand (CD40L), or both. By "CD40 antigen," "CD40 cell surface antigen," "CD40 receptor," or "CD40" is intended a

5 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

10 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

15 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

20 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

25 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 CD40 antigen is displayed on the surface of a variety of cell types, as

30 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 a 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 CD40 ligand binding specificity and antagonist activity of an anti-CD40 therapeutic agent, for example, an anti-CD40 antibody, are known 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. Also see, provisional applications entitled "*Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use*," filed November 4, 2003, November 26, 2003, and April 27, 2004, and assigned U.S. Patent Application Nos. 60/517,337 (Attorney Docket No. PP20107.001 (035784/258442)), 60/525,579 (Attorney Docket No. PP20107.002 (035784/271525)), and 60/565,710 (Attorney Docket No. PP20107.003 (035784/277214)), respectively, and International Patent Application No. PCT/US2004/037152 (Attorney Docket No. PP20107.004 (035784/282916)), also entitled "*Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use*," filed November 4, 2004, and published as WO 2005/044854; the contents of each of which are herein incorporated by reference in their entirety.

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.

In some embodiments of the invention, the stable liquid pharmaceutical compositions of the invention comprise an antagonist anti-CD40 antibody. Such antibodies 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 cellular response. In another embodiment of the invention, the antagonist anti-CD40 antibody is free of significant agonist activity in assays of more than one cellular response (e.g., proliferation and differentiation, or proliferation, differentiation, and, for B cells, antibody production). In some embodiments of the invention, the antagonist anti-CD40 antibody is, for example, the fully human monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding fragment thereof, as noted herein below.

Any of the assays known in the art can be used to determine whether an anti-CD40 antibody acts as an antagonist of one or more B cell responses. In some embodiments, the anti-CD40 antibody acts as an antagonist of at least one B cell response selected from the group consisting of B cell proliferation, B cell

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. Of particular interest are antagonist anti-CD40 antibodies that free of significant agonist activity with respect to B cell proliferation when bound to the human CD40 antigen on the surface of a human B cell.

In one such embodiment, the anti-CD40 antibody is an antagonist of B cell proliferation as measured in a B cell proliferation assay such as that described in Example 4 herein below, and the antagonist anti-CD40 antibody stimulates B cell proliferation at a level that is not more than about 25% greater than the B cell proliferation 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 B cell proliferation induced by a neutral substance or negative control.

In other embodiments, the anti-CD40 antibody is an antagonist of B cell proliferation that is induced by another anti-CD40 antibody, for example, the S2C6 anti-CD40 antibody, as measured in a B cell proliferation assay such as that described in Example 4 herein below, and the level of B cell proliferation stimulated by the other anti-CD40 antibody in the presence of the antagonist anti-CD40 antibody is not more than about 25% of the B cell proliferation induced by the other anti-CD40 antibody in the absence of the antagonist anti-CD40 antibody (i.e., at least 75% inhibition), preferably not more than about 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0.5%, or even not more than about 0.1% of the B cell proliferation induced by the other anti-CD40 antibody in the absence of the antagonist anti-CD40 antibody.

In yet other embodiments, the anti-CD40 antibody is an antagonist of B cell proliferation that is induced by the cell line EL4B5 as measured in the B cell activation assay described in Example 4 herein below, and the level of B cell proliferation stimulated by the EL4B5 cell line in the presence of the antagonist anti-CD40 antibody is not more than about 25% of the B cell proliferation induced by this cell line in the absence of the antagonist anti-CD40 antibody (i.e., at least 75% inhibition), preferably not more than about 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0.5%, or even not more than about 0.1% of the B cell proliferation induced by this cell line in the absence of the antagonist anti-CD40 antibody.

In still other embodiments, the anti-CD40 antibody is an antagonist of human T-cell-induced antibody production by human B cells as measured in the human T-cell helper assay for antibody production by B cells described in Example 4 herein below. In this manner, the level of IgG antibody production, IgM antibody
5 production, or both IgG and IgM antibody production by B cells stimulated by T cells in the presence of the antagonist anti-CD40 antibody is not more than about 50% of the respective antibody production by B cells stimulated by T cells in the absence of the antagonist anti-CD40 antibody (i.e., at least 75% inhibition), preferably not more than about 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0.5%, or even not more than about 0.1%
10 of the respective antibody production by B cells stimulated by T cells in the absence of the antagonist anti-CD40 antibody.

By "CD40 ligand" is intended any peptide, polypeptide, or protein that can bind to and activate one or more CD40 signaling pathways. Thus, "CD40 ligands" include, but are not limited to, full-length CD40 ligand proteins and variants and
15 fragments thereof that retain sufficient activity to carry out the function of binding to and stimulating CD40 signaling on CD40-expressing cells. Modifications to a native CD40 ligand, for example, human CD40 ligand (CD40L; also known as CD154), include, but are not limited to, substitutions, deletions, truncations, extensions, fusion proteins, fragments, peptidomimetics, and the like. In some embodiments of the
20 invention, an assay for assessing biological activity of an antagonist anti-CD40 antibody includes the use of soluble CD40L, for example, soluble recombinant human CD40L (Alexis Corporation, Bingham, Nottinghamshire, UK) to stimulate CD40 signaling on CD40-expressing cells.

By "CD40L-mediated CD40 signaling" is intended any of the biological
25 activities that result from interaction of the cell-surface receptor CD40 with a CD40 ligand. Examples of CD40 signaling are signals that lead to proliferation and survival of CD40-expressing cells, and stimulation of one or more CD40-signaling pathways within CD40-expressing cells. A CD40 "signaling pathway" or "signal transduction pathway" is intended to mean at least one biochemical reaction, or a group of
30 biochemical reactions, that results from interaction of the CD40 receptor with a CD40 ligand, for example, CD40L, and which generates a signal that, when transmitted through the signal pathway, leads to activation of one or more downstream molecules in the signaling cascade. Signal transduction pathways involve a number of signal

000091

transduction molecules that lead to transmission of a signal from the cell-surface CD40 receptor across the plasma membrane of a cell, and through one or more in a series of signal transduction molecules, through the cytoplasm of the cell, and in some instances, into the cell's nucleus. CD40 signal transduction pathways include, for example, the AKT signaling pathway, which leads to activation of AKT, and ultimately activation of NF- κ B via the NF- κ B signaling pathway; and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways, including the MEK/ERK signaling pathway and the MEK/p38 signaling pathway, which lead to activation of ERK and p38, respectively. The balance between activation and blocking of these signaling pathways favors either cell survival or apoptosis.

In some embodiments, the stable pharmaceutical compositions of the invention comprise antagonist anti-CD40 antibodies that block CD40L-mediated CD40 signaling. For a more detailed description of the role of antagonist anti-CD40 antibodies in blocking CD40L-mediated CD40 signaling, see, for example, provisional applications entitled "*Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use*," filed November 4, 2003, November 26, 2003, and April 27, 2004, and assigned U.S. Patent Application Nos. 60/517,337 (Attorney Docket No. PP20107.001 (035784/258442)), 60/525,579 (Attorney Docket No. PP20107.002 (035784/271525)), and 60/565,710 (Attorney Docket No. PP20107.003 (035784/277214)), respectively, and International Patent Application No. PCT/US2004/037152 (Attorney Docket No. PP20107.004 (035784/282916)), also entitled "*Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use*," filed November 4, 2004, and published as WO 2005/044854; the contents of each of which are herein incorporated by reference in their entirety. See also provisional application entitled "*Methods for Diagnosis and Treatment of Proliferative Disorders Mediated by CD40 Signaling*," filed December 9, 2005, and assigned U.S. Patent Application No. 60/749,285 (Attorney Docket No. PP028035.0002 (035784/304312)), and corresponding International Patent Application No. PCT/US2006/019414 (Attorney Docket No. PP028035.0003 (035784/311611)), filed May 18, 2006, and published as WO 2006/125143; and provisional application entitled "*Methods for Diagnosis and Treatment of Diseases Having an Autoimmune and/or Inflammatory Component*," filed December 9, 2005, and assigned U.S. Patent Application No. 60/749,336 (Attorney Docket No. PP028062.0002 (035784/304311)), and

corresponding International Patent Application PCT/US2006/019325 (Attorney Docket No. PP028062.0003 (035784/311608)), filed May 18, 2006, and published as WO 2006/125117; the contents of each of which are herein incorporated by reference in their entirety.

5 The stable liquid pharmaceutical compositions of the present invention comprise anti-CD40 antibodies, particularly antagonist anti-CD40 antibodies and/or antigen-binding fragments thereof. The following terms and definitions apply to such antibodies.

10 “Antibodies” and “immunoglobulins” (Igs) are glycoproteins having the same structural characteristics. The terms are used synonymously. In some instances the antigen specificity of the immunoglobulin may be known.

15 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, antibody chimeras, hybrid antibodies, bispecific antibodies, humanized antibodies, and the like), and recombinant peptides comprising the forgoing.

20 The terms “monoclonal antibody” and “mAb” as used herein refer to an antibody obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, *i.e.*, the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts.

25 “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.

30

The term "variable" refers to the fact that certain portions of the variable domains differ extensively in sequence among antibodies. Variable regions confer antigen-binding specificity. 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 in the framework (FR) regions. The variable domains of native heavy and light chains each comprise four FR regions, largely adopting a β -pleated-sheet configuration, connected by three CDRs, which form loops connecting, and in some cases forming part of, the β -pleated-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 effector functions, such as Fc receptor (FcR) binding, participation of the antibody in antibody-dependent cellular toxicity, 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 "complementarily 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 (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, as herein deemed.

"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.* 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. This region consists of a dimer of one heavy- and one light-chain variable domain in tight, non-covalent association. 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. Fab' fragments are produced by reducing the F(ab')₂ fragment's heavy chain disulfide bridge. 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, IgA1, 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 have ADCC (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity) 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.

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 immunoreceptor 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.

5 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)).

10 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
15 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
20 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
25 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
30 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 V κ genes, J κ segments, and C κ 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 enzyme-linked immunosorbent assay (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.

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. Other anti-CD40 monoclonal antibodies include, but are not limited to, humanized anti-CD40 antibodies, such as SGN-40 (Tai *et al.* (2004) *Cancer Res.* 64:2846-52; U.S. Patent No. 6,838,261), which is the humanized form of the murine

anti-CD40 antibody SGN-14 (Francisco *et al.* (2000) *Cancer Res.* 60:3225-31), and the agonist and antagonist antibodies disclosed in U.S. Patent Application Publication No. 2004/0120948; herein incorporated by reference in their entirety.

Of particular interest to the present invention are antagonist anti-CD40 antibodies or antigen-binding fragments thereof that serve to block CD40L-mediated CD40 signaling, and which may also modulate ADCC, as does, for example, the CHIR-12.12 antibody described herein below.

Antagonist anti-CD40 antibodies for use in the stable liquid pharmaceutical compositions of the invention include monoclonal antibodies or antigen-binding fragments thereof that are capable of specifically binding to human CD40 antigen expressed on the surface of a human cell. In some embodiments, the antagonist anti-CD40 antibodies within the stable liquid pharmaceutical compositions exhibit a strong single-site binding affinity for the CD40 cell-surface antigen. Such monoclonal antibodies 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.

Of particular interest are antagonist anti-CD40 antibodies that are free of significant agonist activity as defined herein above but exhibit antagonist activity when bound to CD40 antigen on human cells, particularly when bound to CD40 antigen on neoplastic human B cells. 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). Suitable monoclonal anti-CD40 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.

000009

Thus, in some embodiments, the antagonist anti-CD40 antibody present in the stable liquid pharmaceutical compositions of the invention is the monoclonal antibody CHIR-5.9 or CHIR-12.12. The CHIR-5.9 and CHIR-12.12 antibodies are fully human anti-CD40 monoclonal antibodies of the IgG₁ 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 IgG₁ 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 subcloned 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 herein. 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 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 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 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 (mouse hybridoma line

131.2F8.5.9 (CMCC#12047) and CHIR-12.12 (mouse hybridoma line
153.8E2.D10.D6.12.12 (CMCC#12056) antibodies have been deposited with the
ATCC (American Type Culture Collection; 10801 University Blvd., Manassas,
Virginia 20110-2209 (USA)) on September 17, 2003, with a patent deposit
5 designation of PTA-5542 and PTA-5543, respectively.

In addition to antagonist activity, anti-CD40 antibodies for use in the stable
liquid pharmaceutical compositions of the present invention can 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
10 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
15 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
20 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.
25 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.

30 Other antagonist anti-CD40 antibodies that share the binding characteristics of
the monoclonal antibodies CHIR-5.9 and CHIR-12.12 described above 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.

Those skilled in the art recognize that the antibodies and antigen-binding fragments of these antibodies described 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.

Additional antagonist anti-CD40 antibodies include the monoclonal antibodies referred to as 5D12, 3A8 and 3C6, which are secreted by a hybridoma having ATCC accession numbers HB 11339, HB 12024 and HB 11340, respectively. See, for example, U.S. Patent No. 6,315,998, herein incorporated by reference in its entirety.

Other antagonist anti-CD40 antibodies are known in the art. See, for example, the human anti-CD40 antibody produced by the hybridoma designated F4-465 disclosed in U.S. Patent Application Publication Nos. 20020142358 and 20030059427; herein incorporated by reference in their entirety. F4-465 was obtained from the HAC mouse (Kuroiwa *et al.* (2000) *Nature Biotech.* 10:1086 (2000)) and therefore expresses the human lambda light chain.

Production of Antibodies for the Pharmaceutical Compositions of the Invention

The antibodies for use in the pharmaceutical compositions of the present invention, for example, the antagonist anti-CD40 antibodies disclosed herein, 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 antigen of interest, 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 the protein of interest, for example, 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. In the case of CD40, 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.

5 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
10 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; for example, in the case of anti-CD40 antibodies, the CD40 cell surface antigen. Furthermore, in contrast to conventional (polyclonal) antibody preparations that
15 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
20 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
25 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
30 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 antagonist anti-CD40 antibodies 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

00005

chain, respectively. By transfecting the two proteins on separate vectors, chimeric antibodies can be produced. Another advantage is the correct glycosylation of the antibody.

5 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
10 entirety.

Additionally, antibodies for use in the pharmaceutical compositions of the invention can be chimeric antibodies that have the desired binding characteristics. Thus, for example, chimeric anti-CD40 antibodies for use in the methods of the invention could have the binding characteristics of the CHIR-5.9 and CHIR-12.12
15 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
20 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 antigen of interest, i.e., the CD40 antigen. The non-human source can be any vertebrate source that can be used to generate antibodies to a human antigen or material comprising a human CD40 antigen. Such non-human sources include, but
25 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
30 "immunologically active" when used in reference, for example, to chimeric anti-CD40 antibodies, means a chimeric antibody that binds human CD40.

By "humanized" is intended forms of 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

5 "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

10 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

15 dangerous immune response in humans and there was a loss of affinity. Humanized antibodies, for example, humanized anti-CD40 antibodies, for use in the pharmaceutical compositions of the present invention have binding characteristics similar to those exhibited by the parent antibody of interest, for example, the CHIR-5.9 and CHIR-12.12 monoclonal antibodies described herein.

20 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;

25 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

30 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
5 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
10 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
15 producing humanized antibodies having improved affinity for a predetermined antigen are disclosed.

The present invention can also be practiced using xenogeneic or modified antibodies produced in a non-human mammalian host, more particularly a transgenic mouse, characterized by inactivated endogenous immunoglobulin (Ig) loci. In such
20 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
25 reference.

In some embodiments, fully human antibodies to CD40, for example, 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
30 by reference. To produce the antibodies disclosed herein, mice transgenic for the human Ig G₁ 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 anti-CD40 antibodies useful in the stable liquid

000003

pharmaceutical compositions 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.

5 Fragments of a particular antibody of interest, for example, an anti-CD40 antibody, including antagonist anti-CD40 antibody, are suitable for use in the stable liquid pharmaceutical compositions of the invention so long as they retain the desired affinity of the full-length antibody. Thus, for example, 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
10 antibody. Thus, for example, a fragment of a full-length antagonist anti-CD40 antibody will specifically bind a human CD40 antigen expressed on the surface of a human cell, and is free of significant agonist activity but exhibits antagonist activity when bound to a CD40 antigen on a human CD40-expressing cell. Such fragments are referred to herein as "antigen-binding" fragments.

15 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
20 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,
25 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. Rosenberg and Moore (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315.
30 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 for use in the stable liquid pharmaceutical compositions 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 antibodies, particularly 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 present invention are fusion proteins comprising an antibody of interest, for example, an antagonist anti-CD40 antibody, 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 elsewhere herein.

Any known antibody having the binding specificity of interest 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 can also be used in the stable liquid pharmaceutical compositions of the present invention. The variant antibodies can be routinely tested for the particular activity, for example, antagonist activity, affinity, and specificity using methods described herein.

The antagonist anti-CD40 antibody produced by any of the methods described above, or any other method not disclosed herein, can be used in a manner similar to the CHIR-12.12 or CHIR-5.9 antibody where 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; inhibition of proliferation of human malignant B cells; deletion, anergy and/or tolerance induction of CD40-bearing target cells or cells bearing cognate ligands to CD40 including, but not limited to, T cells and B cells; induction of expansion or activation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (see for

no 101

example, donor alloantigen-specific tissue rejection via CD40-CD40L interference, van Maurik *et al.* (2002) *J. Immunol.* 169:5401-5404); cytotoxicity via any mechanism (including, but not limited to, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), complement-dependent cytotoxicity (CDC), down-regulation of proliferation, and/or apoptosis in target cells); modulation of target cell cytokine secretion and/or cell surface molecule expression; and combinations thereof. 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 provisional applications entitled "*Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use*," filed November 4, 2003, November 26, 2003, and April 27, 2004, and assigned U.S. Patent Application Nos. 60/517,337 (Attorney Docket No. PP20107.001 (035784/258442)), 60/525,579 (Attorney Docket No. PP20107.002 (035784/271525)), and 60/565,710 (Attorney Docket No. PP20107.003 (035784/277214)), respectively; and International Patent Application No. PCT/US2004/037152 (Attorney Docket No. PP20107.004 (035784/282916)), also entitled "*Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use*," filed November 4, 2004, and published as WO 2005/044854; the contents of each of which are herein incorporated by reference in their entirety. See also the assays described in provisional application entitled "*Methods for Diagnosis and Treatment of Proliferative Disorders Mediated by CD40 Signaling*," filed December 9, 2005, and assigned U.S. Patent Application No. 60/749,285 (Attorney Docket No. PP028035.0002 (035784/304312)), and corresponding International Patent Application No. PCT/US2006/019414 (Attorney Docket No. PP028035.0003 (035784/311611)), filed May 18, 2006, and published as WO 2006/125143; and provisional application entitled "*Methods for Diagnosis and Treatment of Diseases Having an Autoimmune and/or Inflammatory Component*," filed December 9, 2005, and assigned U.S. Patent Application No. 60/749,336 (Attorney Docket No. PP028062.0002 (035784/304311)), and corresponding International Patent Application No. PCT/US2006/019325 (Attorney Docket No. PP028062.0003 (035784/311608)), filed May 18, 2006, and published as WO 2006/125117; the contents of each of which are herein incorporated by reference in their entirety. Also see 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 SEQ ID NO:10, encoded by the sequence set forth 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 SEQ ID NO:12, encoded by the sequence set forth in 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, chemilumescers, 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 ^3H . 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 antigen-binding fragments thereof, may be conjugated prior to use in the pharmaceutical compositions of the present invention. Methods for producing conjugated antibodies are known in the art. Thus, the 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 Srivastava 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 ¹²⁵I, 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, an antagonist anti-CD40 antibody of interest 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 Srivastava 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.

Variants of Antibodies

The pharmaceutical compositions of the present invention can be formulated using variants of an antagonist anti-CD40 antibody known in the art. Such variants will retain the desired binding properties of the parent antibody. Thus, for example, where the antagonist anti-CD40 antibody to be formulated is a variant of the parent CHIR-12.12 or CHIR-5.9 antibody, the variant antibody will retain the binding properties of the parent CHIR-12.12 or CHIR-5.9 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 $\leftrightarrow$ Ala, Val $\leftrightarrow$ Ile $\leftrightarrow$ Leu, Asp $\leftrightarrow$ Glu, Lys $\leftrightarrow$ Arg, Asn $\leftrightarrow$ Gln, and Phe $\leftrightarrow$ Trp $\leftrightarrow$ Tyr.

In constructing variants of an antagonist anti-CD40 antibody polypeptide of interest, for example, the CHIR-12.12 or CHIR-5.9 antibody, modifications are made such that variants continue to possess the desired activity, i.e., similar binding affinity and, in the case of antagonist anti-CD40 antibodies, 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 antiCD40 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 antibody, 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.

5 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
10 homology search algorithm).

Methods of Therapy Using the Pharmaceutical Compositions of the Invention

The pharmaceutical compositions of the present invention find use in treating a subject having a cancer or premalignant condition that is associated with CD40-
15 expressing cells, or for treating an inflammatory disease and/or autoimmune disease that is associated with CD40-expressing cells. "Treatment" is herein defined as the application or administration of a pharmaceutical composition comprising the antagonist anti-CD40 antibody to a subject, or application or administration of a pharmaceutical composition comprising the antagonist anti-CD40 antibody to an
20 isolated tissue or cell line from a subject, where the subject 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 "subject" is intended any animal. Preferably the subject is mammalian,
25 must preferably the subject is human. Mammals of particular importance other than human include, but are not limited to, dogs, cats, cows, horses, sheep, and pigs.

When administration is for the purpose of treatment, administration may be for a prophylactic or therapeutic purpose. When provided prophylactically, the pharmaceutical composition is provided in advance of any symptom. The
30 prophylactic administration of the pharmaceutical composition serves to prevent or attenuate any subsequent symptom. When provided therapeutically, the pharmaceutical composition is provided at (or shortly after) the onset of a symptom.

The therapeutic administration of the pharmaceutical composition serves to attenuate any actual symptom.

Typical routes of administration include, but are not limited to, oral administration and parenteral administration, including intravenous, intramuscular, intrathecal, intranasal, sublingual, intra-arterial and intraperitoneal injection or infusion, and subcutaneous injection. Methods to accomplish this administration are known to those of ordinary skill in the art.

In preferred embodiments, the pharmaceutical compositions of the invention are administered intravenously. 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 antagonist 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 pharmaceutically effective amount of a pharmaceutical composition of the invention is administered to a subject. By "pharmaceutically effective amount" is intended an amount that is useful in the treatment of a disease or condition, where treatment can be for a prophylactic or therapeutic purpose as noted herein above. In this manner, a pharmaceutically effective amount of the composition will administer a therapeutically effective dose or amount of the antagonist anti-CD40 antibody to the subject in need of treatment. By "therapeutically effective dose or amount" or "effective amount" is intended an amount of the antagonist anti-CD40 antibody that, when administered brings about a positive therapeutic response with respect to treatment of a patient with a disease comprising CD40-expressing cells. In some embodiments of the invention, the therapeutically effective dose of the antagonist anti-CD40 antibody, for example, the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding 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 pharmaceutical compositions of the invention find use in treating any subject having a cancer or pre-malignant condition that is responsive to treatment with an anti-CD40 therapeutic agent, more particularly, an antagonist anti-CD40 antibody. Methods for determining responsiveness of a cancer or pre-malignant condition to treatment with an anti-CD40 antibody include diagnostic and prognostic assays, for example, the assays described in the copending and commonly owned provisional patent application entitled "*Methods for Diagnosis and Treatment of Proliferative Disorders Mediated by CD40 Signaling*," filed December 9, 2005, and assigned U.S. Patent Application No. 60/749,285 (Attorney Docket No. PP028035.0002 (035784/304312), and corresponding International Patent Application No. PCT/US2006/019414 (Attorney Docket No. PP028035.0003 (035784/311611)), filed May 18, 2006, and published as WO 2006/125143; the contents of which are herein incorporated by reference in their entirety. Similarly, the pharmaceutical composition of the invention find use in treating any subject having an inflammatory and/or autoimmune disease that is responsive to treatment with an anti-CD40 therapeutic agent, particularly an anti-CD40 antibody. Methods for determining responsiveness of an inflammatory and/or autoimmune disease to treatment with an anti-CD40 antibody include diagnostic and prognostic assays, for example, the assays described in the copending and commonly owned provisional patent application entitled "*Methods for Diagnosis and Treatment of Diseases Having an Autoimmune and/or Inflammatory Component*," filed December 9, 2005, and assigned U.S. Patent Application No. 60/749,336 (Attorney Docket No. PP028062.0002 (035784/304311), and corresponding International Patent Application No. PCT/US2006/019325 (Attorney Docket No. PP028062.0003 (035784/311608)), filed May 18, 2006, and published as WO 2005/125117; the contents of which are herein incorporated by reference in their entirety.

"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.

“Neoplastic,” as used herein, refers to any form of dysregulated or unregulated cell growth, whether malignant or benign, resulting in abnormal tissue growth. Thus, “neoplastic cells” include malignant and benign cells having dysregulated or unregulated cell growth.

5 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 the antagonist
10 anti-CD40 antibody-containing pharmaceutical compositions of the invention causes a physiological response that is beneficial with respect to treatment of cancers and pre-malignant conditions associated with stimulation of CD40 signaling on CD40-expressing cells in a human.

The terms “cancer” and “cancerous” refer to or describe the physiological
15 condition in mammals that is typically characterized by unregulated cell growth. Examples of cancer include, but are not limited to, lymphoma and leukemia, and solid tumors. By “B cell-related cancer” or “cancer of B-cell lineage” is intended any type of cancer in which the dysregulated or unregulated cell growth is associated with B cells.

20 By “refractory” in the context of a cancer is intended the particular cancer is resistant to, or non-responsive to, therapy with a particular therapeutic agent, for example, an antagonist anti-CD40 antibody of interest. A cancer can be refractory to therapy with a particular therapeutic agent either from the onset of treatment with the particular therapeutic agent (i.e., non-responsive to initial exposure to the therapeutic
25 agent), or as a result of developing resistance to the therapeutic agent, either over the course of a first treatment period with the therapeutic agent or during a subsequent treatment period with the therapeutic agent.

The pharmaceutical compositions of the present invention find use in treating a subject that is in need of therapeutic intervention for a cancer or pre-malignant
30 condition that is mediated by stimulation of CD40 signaling on CD40-expressing cells, or for any inflammatory or autoimmune disease that is mediated by CD40 signaling on CD40-expressing cells. By “CD40-expressing cell” is intended normal, pre-malignant, and malignant cells expressing CD40 antigen. In some embodiments,

the CD40-expressing cell is a malignant B cell. 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, and the like. In other embodiments, the CD40-expressing cell is a carcinoma or sarcoma cell. By "CD40-expressing carcinoma cell" or CD40-expressing sarcoma cell" is intended any malignant (i.e., neoplastic) or pre-malignant carcinoma or sarcoma cell of a solid tumor that expresses the CD40 cell-surface antigen. For purposes of the present invention, cancerous and pre-cancerous or pre-malignant cells that express the CD40 antigen are referred to as "CD40-expressing neoplastic cells." 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. Where treatment with an antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof is warranted, the pharmaceutical composition comprising the antagonist anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof can be administered by any suitable route of administration.

The subject who is in need of treatment intervention with a pharmaceutical composition of the present invention can be afflicted with, or at risk of developing or relapsing with, any cancer or pre-malignant condition that is mediated by CD40 signaling on CD40-expressing neoplastic cells. Examples of such cancers and pre-malignant conditions include, but are not limited to, any of the cancers of B-cell lineage, non-B cell hematological malignancies, and solid tumors that are known to be mediated via CD40 signaling on CD40-expressing neoplastic cells.

Examples of cancers of B-cell lineage that comprise CD40-expressing neoplastic cells are acute lymphoblastic leukemia (ALL), chronic lymphocytic leukemia (CLL), prolymphocytic leukemia (PLL), hairy cell leukemia, Hodgkin's disease, multiple myeloma, Waldenstrom's macroglobulinemia, heavy chain disease, and the lymphomas, including, but not limited to, diffuse small lymphocytic lymphoma, , follicular, DLBCL, mucosal associated lymphoid tissue lymphoma, monocytoid B cell lymphoma, splenic lymphoma, lymphomatoid granulomatosis,

intravascular lymphomatosis, immunoblastic lymphoma, AIDS-related lymphoma, and the like.

Thus, the pharmaceutical compositions of the invention find use in the treatment of subjects having 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 pharmaceutical compositions of the invention are useful in 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), 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; and unclassifiable low-grade or high-grade B cell lymphomas.

The pharmaceutical compositions of the present invention can also be used to treat subjects having the pre-malignant condition known as MGUS (monoclonal gammopathy of undetermined significance). Approximately 25% of patients with MGUS eventually develop multiple myeloma (MM) or a related plasma cell disorder (Kyle (1993) *Mayo Clinic. Proc.* 68:26-36). Proliferation of malignant plasma cells

00112

in the bone marrow, detection of a serum or urine monoclonal protein (M protein), anemia, hypercalcemia, renal insufficiency, and lytic bone lesions are clinical manifestations of MM, while MGUS is clinically recognized as the presence of M protein in the serum or urine without other clinical features of MM (see, for example, Kyle and Lust (1989) *Semin. Hematol.* 26:176-200; Greipp and Lust *Stem Cells* (1995) 13:10-21). MGUS patients are asymptomatic and have stable measurements of M protein (Kyle (1993) *Mayo Clinic. Proc.* 68:26-36). Once MGUS is identified in a subject, maintenance therapy with an appropriate pharmaceutical composition of the present invention, for example, a composition comprising an antagonist anti-CD40 antibody disclosed herein, may block the development of multiple myeloma in these subjects.

In particular, the pharmaceutical compositions of the invention are useful for treating B cell lymphomas, including those listed above, that are refractory to (i.e., resistant to, or have become resistant to) first-line oncotherapeutic treatments. The term "oncotherapeutic" is intended to mean a treatment for cancer such as chemotherapy, surgery, radiation therapy, single anti-cancer antibody therapy, and combinations thereof. Subpopulations of patients for whom treatment intervention with one or more anti-CD40 antibodies that modulates CD40L-mediated CD40 signaling, modulates ADCC, or both is desirable.

The pharmaceutical compositions of the present invention are also useful for treating non-B cell related hematological malignancies. Such malignancies include, but are not limited to, acute leukemias; myeloblastic leukemias; acute myelocytic leukemias; promyelocytic leukemia; myelomonocytic leukemia; monocytic leukemia; erythroleukemia; granulocytic leukemia (chronic myelocytic leukemia); polycythemia vera; and the like.

Solid tumors that comprise CD40-expressing neoplastic cells, and thus beneficially respond to treatment with the pharmaceutical compositions of the present invention, include, but are not limited to, ovarian, lung (for example, non-small cell lung cancer of the squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, and large cell carcinoma types, and small cell lung cancer), breast, colon, kidney (including, for example, renal cell carcinomas), bladder, liver (including, for example, hepatocellular carcinomas), gastric, cervical, prostate, nasopharyngeal, thyroid (for example, thyroid

00113

papillary carcinoma), skin cancers such as melanoma, and sarcomas, including, for example, osteosarcomas and Ewing's sarcomas.

Beneficial results that can be achieved by administering a pharmaceutical composition of the invention to a subject with a cancer or pre-malignant condition include any positive therapeutic response with respect to that cancer or condition. By "positive therapeutic response" in the context of cancer treatment is intended an improvement in the disease in association with the anti-tumor activity of the anti-CD40 therapeutic agent and/or an improvement in the symptoms associated with the disease of interest. 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, a positive therapeutic response would refer to one or more of the following improvements in the disease: (1) a reduction in tumor size; (2) a reduction in the number of cancer (i.e., neoplastic) cells; (3) an increase in neoplastic cell death; (4) inhibition of neoplastic cell survival; (4) inhibition (i.e., slowing to some extent, preferably halting) of tumor growth; (5) inhibition (i.e., slowing to some extent, preferably halting) of cancer cell infiltration into peripheral organs; (6) inhibition (i.e., slowing to some extent, preferably halting) of tumor metastasis; (7) the prevention of further tumor outgrowths; (8) an increased patient survival rate; and (9) some extent of relief from one or more symptoms associated with the cancer. Positive therapeutic responses in any given malignancy can be determined by standardized response criteria specific to that malignancy. 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, bone scan imaging, endoscopy, and tumor biopsy sampling including bone marrow aspiration (BMA) and counting of tumor cells in the circulation. In addition to these positive therapeutic responses, the subject undergoing therapy with the antagonist anti-CD40 antibody-containing pharmaceutical composition of the invention 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. For pre-malignant conditions, therapy with an anti-CD40 therapeutic agent

may block and/or prolong the time before development of a related malignant condition, for example, development of multiple myeloma in subjects suffering from monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS).

5 By "anti-inflammatory activity" is intended a reduction or prevention of inflammation. Therapy with an antagonist anti-CD40 antibody-containing liquid pharmaceutical composition of the invention causes a physiological response that is beneficial with respect to treatment of an autoimmune disease and/or inflammatory disease, where the disease involves cells expressing the CD40 antigen. It is recognized that the compositions of the invention may be useful in preventing
10 phenotypic change in cells such as proliferation, activation, and the like.

The subject who is undergoing treatment intervention with an antagonist anti-CD40 antibody-containing liquid pharmaceutical composition of the invention can be afflicted with, or at risk of developing or relapsing with, any inflammatory or autoimmune disease that is mediated by CD40 signaling on CD40-expressing cells.
15 Inflammatory diseases are characterized by inflammation and tissue destruction, or a combination thereof. "Inflammatory disease" includes any inflammatory immune-mediated process where the initiating event or target of the immune response involves non-self antigen(s), including, for example, alloantigens, xenoantigens, viral antigens, bacterial antigens, unknown antigens, or allergens.

20 Further, for purposes of the present invention, the term "inflammatory disease(s)" includes "autoimmune disease(s)." As used herein, the term "autoimmunity" is generally understood to encompass inflammatory immune-mediated processes involving "self" antigens. In autoimmune diseases, self antigen(s) trigger host immune responses.

25 Also, the pharmaceutical compositions of the present invention can be used for treatment of inflammation associated with tissue transplant rejection. "Transplant rejection" or "graft rejection" refers to any host-mounted immune response against a graft including but not limited to HLA antigens, blood group antigens, and the like.

30 The pharmaceutical compositions of the invention can also be used for treatment of graft versus host disease, such as that associated with bone marrow transplantation, for example. In such graft versus host disease, the donor bone marrow includes lymphocytes and cells that mature into lymphocytes. The donor's lymphocytes recognize the recipient's antigens as non-self and mount an

00115

inflammatory immune response. Hence, as used herein, "graft versus host disease" or "graft versus host reaction" refers to any T cell mediated immune response in which donor lymphocytes react to the host's antigens.

5 Examples of autoimmune and/or inflammatory disorders include, but are not limited to, systemic lupus erythematosus (SLE), discoid lupus, lupus nephritis, sarcoidosis, inflammatory arthritis, including juvenile arthritis, rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, Reiter's syndrome, ankylosing spondylitis, and gouty arthritis, rejection of an organ or tissue transplant, hyperacute, acute, or chronic rejection and/or graft versus host disease, multiple sclerosis, hyper IgE syndrome, polyarteritis
10 nodosa, primary biliary cirrhosis, inflammatory bowel disease, Crohn's disease, celiac's disease (gluten-sensitive enteropathy), autoimmune hepatitis, pernicious anemia, autoimmune hemolytic anemia, psoriasis, scleroderma, myasthenia gravis, autoimmune thrombocytopenic purpura, autoimmune thyroiditis, Grave's disease, Hashimoto's thyroiditis, immune complex disease, chronic fatigue immune dysfunction
15 syndrome (CFIDS), polymyositis and dermatomyositis, cryoglobulinemia, thrombolytic, cardiomyopathy, pemphigus vulgaris, pulmonary interstitial fibrosis, Type I and Type II diabetes mellitus, type 1, 2, 3, and 4 delayed-type hypersensitivity, allergy or allergic disorders, unwanted/unintended immune responses to therapeutic proteins (see for example, U.S. Patent Application No. US 2002/0119151 and Koren,
20 *et al.* (2002) *Curr. Pharm. Biotechnol.* 3:349-60), asthma, Churg-Strauss syndrome (allergic granulomatosis), atopic dermatitis, allergic and irritant contact dermatitis, urticaria, IgE-mediated allergy, atherosclerosis, vasculitis, idiopathic inflammatory myopathies, hemolytic disease, Alzheimer's disease, chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, and the like. In some other embodiments, the
25 pharmaceutical compositions of the present invention are used to treat individuals for pulmonary inflammation, including, but not limited to, lung graft rejection, asthma, sarcoidosis, emphysema, cystic fibrosis, idiopathic pulmonary fibrosis, chronic bronchitis, allergic rhinitis and allergic diseases of the lung such as hypersensitivity pneumonitis, eosinophilic pneumonia, bronchiolitis obliterans due to bone marrow and/or lung transplantation or other causes, graft atherosclerosis/graft phlebosclerosis,
30 as well as pulmonary fibrosis resulting from collagen, vascular, and autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and lupus erythematosus.

00118

In other embodiments, the pharmaceutical compositions of the present invention are useful for treating autoimmune diseases and inflammatory diseases that are initially resistant to, or which develop resistance to other known therapeutic treatments whose mode of action is other than through modulation of CD40L-mediated CD40 signaling, modulation of ADCC, or both. The pharmaceutical compositions of the invention can be used to treat subpopulations of patients for whom treatment intervention with one or more antagonist anti-CD40 antibodies that modulates CD40L-mediated CD40 signaling, modulates ADCC, or both is desirable.

Beneficial results that can be achieved by administering the pharmaceutical compositions of the invention to a subject with an inflammatory disease or autoimmune disease include any positive therapeutic response with respect to that disease. By "positive therapeutic response" in the context of an autoimmune disease and/or inflammatory disease is intended an improvement in the disease in association with the anti-inflammatory activity of these antibodies or antigen-binding fragments thereof, and/or an improvement in the symptoms associated with the disease. That is, an anti-proliferative effect, the prevention of further proliferation of the CD40-expressing cell, a reduction in the inflammatory response including but not limited to reduced secretion of inflammatory cytokines, adhesion molecules, proteases, immunoglobulins (in instances where the CD40 bearing cell is a B cell), combinations thereof, and the like, increased production of anti-inflammatory proteins, a reduction in the number of autoreactive cells, an increase in immune tolerance, inhibition of autoreactive cell survival, and/or a decrease in one or more symptoms mediated by stimulation of CD40-expressing cells can be observed. Such positive therapeutic responses are not limited to the route of administration and may comprise administration to the donor, the donor tissue (such as for example organ perfusion), the host, any combination thereof, and the like.

Clinical response can be assessed using screening techniques such as magnetic resonance imaging (MRI) scan, x-radiographic imaging, computed tomographic (CT) scan, flow cytometry or fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis, histology, gross pathology, and blood chemistry, including but not limited to changes detectable by ELISA, RIA, chromatography, and the like. In addition to these positive therapeutic responses, the subject undergoing therapy with an antagonist anti-CD40 antibody-containing liquid pharmaceutical composition of the

invention may experience the beneficial effect of an improvement in the symptoms associated with the disease.

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

5

EXPERIMENTAL

CHIR-12.12 is a fully humanized anti-CD40 IgG₁ monoclonal antibody produced by a CHO cell culture process. The molecule has a molecular weight of 150 kDa, and the molecular structure consists of two heavy chains and two light chains
10 linked together by disulfide bonds. CHIR-12.12 targets the human CD40 cell-surface receptor protein. It is a strong antagonist and inhibits *in vitro* CD40 ligand-mediated proliferation of normal B cells, as well as inhibiting *in vitro* CD40 ligand-mediated proliferation of cancer cells from NHL and CLL patients. Hybridoma line
15 153.8E2.D10.D6.12.12 (CMCC#12056) expressing the CHIR-12.12 antibody has been deposited with the American Type Culture Collection [ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209 (USA)] on September 17, 2003, under Patent Deposit Number PTA-5543.

Without being bound by theory, the CHIR-12.12 antibody is a dual action antagonist anti-CD40 monoclonal antibody having a unique combination of attributes.
20 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
25 lysis.

For a more detailed description of the biological activities of CHIR-12.12, and the assays used to measure them, see provisional applications entitled "*Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use*," filed November 4, 2003, November 26, 2003, and April 27, 2004, and assigned U.S. Patent Application
30 Nos. 60/517,337 (Attorney Docket No. PP20107.001 (035784/258442)), 60/525,579 (Attorney Docket No. PP20107.002 (035784/271525)), and 60/565,710 (Attorney Docket No. PP20107.003 (035784/277214)), respectively, and International Patent Application No. PCT/US2004/037152 (Attorney Docket No. PP20107.004

(035784/282916)), also entitled "*Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use*," filed November 4, 2004, and published as WO 2005/044854; the contents of each of which are herein incorporated by reference in their entirety. See also International Publication Nos. WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307, and WO 2005/044294; the contents of each of which are herein incorporated by reference in their entirety. See also the assays described in provisional application entitled "*Methods for Diagnosis and Treatment of Proliferative Disorders Mediated by CD40 Signaling*," filed December 9, 2005, and assigned U.S. Patent Application No. 60/749,285 (Attorney Docket No. PP028035.0002 (035784/304312)), and corresponding International Patent Application No. PCT/US2006/019414 (Attorney Docket No. PP028035.0003 (035784/311611)), filed May 18, 2006, and published as WO 2006/125143; and provisional application entitled "*Methods for Diagnosis and Treatment of Diseases Having an Autoimmune and/or Inflammatory Component*," filed December 9, 2005, and assigned U.S. Patent Application No. 60/749,336 (Attorney Docket No. PP028062.0002 (035784/304311), and corresponding International Patent Application No. (Attorney Docket No. PP028062.0003 (035784/311608)), filed May 18, 2006, and published as WO 2006/125117; the contents of each of which are herein incorporated by reference in their entirety.

The primary clinical applications of CHIR-12.12 are treatment of B-cell related malignancies, including chronic lymphocytic leukemia (CLL), multiple myeloma (MM), and non-Hodgkin's lymphoma (NHL), and autoimmune and/or inflammatory diseases associated with CD40-expressing cells. The CHIR-12.12 drug product for clinical trials is formulated at 20 mg/ml CHIR-12.12 antibody in a liquid formulation. The following studies were undertaken to determine optimal buffer, isotonicizing agent, and various excipients for stabilizing the antibody in the liquid formulation.

Example 1: Effect of Various Buffer Species and Methionine on Stabilization of CHIR-12.12

Solution conditions (e.g., pH, buffer species, and ionic strength) and excipients (e.g., surfactants and stabilizers) are critical factors for stability of a protein in liquid formulation. Physicochemical stability of CHIR-12.12 is optimal at pH 5.5.

However, CHIR-12.12 protein can degrade via aggregation and fragmentation under unfavorable solution conditions; it can also oxidize, especially in the presence of peroxide impurities and/or trace amounts of metals introduced with raw excipient materials such as Tween. The following experiments were conducted to identify the best buffer species and appropriate excipients to stabilize CHIR-12.12 monoclonal antibody against aggregation, fragmentation, and oxidation when formulated at the optimum pH 5.5.

Materials

The CHIR-12.12 drug substance (DS) lots for the study were CHO-derived purified bulk lot # CD021105A and lot # PD010705A. The DS lots were produced at Xoma, Ltd (Berkeley, CA). The formulation samples for this study were prepared by dialysis of the DS against respective buffer solutions followed by spiking with the desired amount of Tween. The concentration of CHIR-12.12 protein in all the samples was approximately 20 mg/ml.

Analytical Methods

Size-Exclusion Chromatography (SEC).

SEC-HPLC separates molecules in order of decreasing molecular weight. Consequently, CHIR-12.12 aggregates are the first to elute from the HPLC column, followed by the monomer, with the fragments eluting last. Purity, aggregation, and fragmentation of CHIR-12.12 were analyzed by a Waters Alliance HPLC using Tosohaas TSK-GEL 3000SW_{XL} column, 50 mM sodium phosphate, 200 mM NaCl, pH 7.0 as mobile phase at a flow rate of 0.7 mL/min.

Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC).

Oxidation of CHIR-12.12 was measured using a Waters Alliance HPLC system with a Tosoh TSK gel butyl-NPR column, 2 M ammonium sulfate/20 mM Tris, pH 7.0 as mobile phase A and 20 mM Tris, pH 7.0 as mobile phase B at a flow rate of 1.0 ml/min. CHIR-12.12 antibody is digested with papain to yield Fab and Fc fragments. The oxidation products of CHIR-12.12 are oxidized Fc fragments (metSO), which are pre-Fc species eluting between the main Fab species and the main Fc species from the HPLC column.

Experiments and Results

Stabilization Effect of Citrate Buffer on Aggregation and Fragmentation.

CHIR-12.12 from DS lot #PD010705A was formulated at 20 mg/ml in 10 mM
5 citrate, acetate, succinate, or phosphate buffer solution with 150 mM NaCl, 0.1%
(w/v) Tween 80 and pH 5.5. The formulation samples were filled as 1.2 ml solutions
into 3 cc glass vials and stored at 5°C, 25°C, and 40°C. The CHIR-12.12 stability
samples were analyzed at designated time points by SEC assay.

Figures 1-3 show the SEC analysis for purity, aggregates, and fragments,
10 respectively, in the samples stored at 25°C. Figures 4-6 summarize the SEC analysis
for purity, aggregates, and fragments, respectively, in the samples stored at 40°C. All
the results show that the citrate-based formulation samples remained at the highest
purity and lowest aggregation and fragmentation levels among the four formulations
tested. Although there was little change detected for the samples stored at 5°C through
15 5 months (data not shown), the accelerated SEC data predicts that citrate buffer will
likely be superior to the other three commonly used buffer species in improving the
long-term real-time stability of CHIR-12.12 against aggregation and fragmentation.

Oxidation Inhibition Effect of Citrate Buffer on CHIR-12.12.

20 The CHIR-12.12 stability samples were prepared in citrate, acetate, and
succinate buffers with 0.1% and 0.2% (w/v) Tween 80. The samples were stored at
5°C, 25°C, and 40°C and analyzed by Hydrophobic Interaction Chromatography
(HIC) for oxidation at the predetermined time points. The oxidation products of
CHIR-12.12 were measured as a percentage of sums of the Pre-Fc peak species, i.e.,
25 Pre-Fc%. The results in Table 1 show that the citrate-based formulation generated
fewer oxidation products than the succinate- and acetate-buffered formulations,
indicating that the citrate buffer minimized the oxidation of CHIR-12.12. These
results suggest that citric acid probably served as a chelating agent to inhibit trace-
metal-induced oxidation of CHIR-12.12 protein.

30 The SEC and HIC analyses indicate that citrate buffer is superior to succinate,
acetate, and phosphate buffer species in protecting CHIR-12.12 from aggregation and
fragmentation. Citrate buffer is also superior to succinate and acetate buffers as it
minimizes oxidation of CHIR-12.12 protein.

00121

Table 1. Effect of buffer species on oxidation of CHIR-12.12 (20 mg/ml) as measured by HIC assay.

Formulation Buffer with Tween 80		10 mM Citrate 150 mM NaCl pH 5.5	10 mM Acetate 150 mM NaCl pH 5.5	10 mM Succinate 150 mM NaCl pH 5.5
Tween 80 Concentration	Storage	Pre-Fc%	Pre-Fc%	Pre-Fc%
0.1% (w/v)	5°C, 5 mo	0.0	0.0	0.0
	25°C, 5 mo	2.6	7.1	9.4
	40°C, 3 mo	5.6	N/D*	13.5
0.2% (w/v)	5°C, 5 mo	0.0	0.0	N/D
	5°C, 8 mo	2.0	2.0	2.2
	25°C, 5 mo	3.0	10.7	11.5
	25°C, 8 mo	4.8	18.1	19.4
	40°C, 3 mo	7.7	N/D	16.0

*N/D, not determined.

Oxidation Inhibition Effect of L-Methionine on CHIR-12.12.

5 DS lot #CD021105A was formulated at 20 mg/ml in 10 mM sodium
citrate/citric acid, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 80 or Tween 20 as well as various
amount (0-5 mM) of L-methionine. The formulation samples were filled at 2.5 ml into
3 cc vials and stored at 40°C. Table 2 shows HIC results for the samples at initial
time and at 40°C for 3 months. At initial time, the oxidation of CHIR-12.12 in all the
10 formulations was comparable to the original bulk drug substance (DS) lot # CD
021105A. The oxidation levels in the formulations without L-methionine were more
than doubled upon storage at 40°C for 3 months. However, the oxidation level in the
formulations containing L-methionine had little change throughout 3 months storage
at 40°C.

15 The results indicate that 5 mM L-methionine was effective and sufficient in
preventing the oxidation of CHIR-12.12 under the highly stressed storage conditions.
The oxidation inhibition effect of L-methionine on CHIR-12.12 was confirmed by
Lyc- peptide map.

Table 2. Inhibition effect of L-methionine on CHIR-12.12 oxidation.

Formulations with 20 mg/ml CHIR-12.12	Pre-Fc%	
	Time 0	3 mos at 40°C
Bulk CHIR-12.12 DS lot# CD 021105A	1.7	N/D*
10 mM sodium citrate/citric acid, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-80, pH 5.5	1.6	4.2
10 mM sodium citrate/citric acid, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-80, 2 mM L-methionine, pH 5.5	1.6	1.6
10 mM sodium citrate/citric acid, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH 5.5	1.7	3.9
10 mM sodium citrate/citric acid, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, 2 mM L-methionine, pH 5.5	1.5	1.1
10 mM sodium citrate/citric acid, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, 5 mM L-methionine, pH 5.5	1.5	1.2

*N/D, not determined.

5 In summary, citrate buffer minimizes aggregation, fragmentation, and oxidation of CHIR-12.12, and therefore represents an optimal buffer for a CHIR-12.12 liquid formulation. L-methionine effectively inhibits oxidation of CHIR-12.12, with 5 mM L-methionine being preferred.

10 Example 2: Stabilizing Effect of Arginine-HCl on CHIR-12.12

 The following study was aimed at selecting a tonicifying agent and stabilizer for long-term storage stability of CHIR-12.12 formulated as a liquid pharmaceutical composition intended for administration via intravenous infusion. Although NaCl is the most commonly used isotonicizing agent for protein parenteral products, it may not have optimal stabilizing effects on antibody therapeutics. This study reports on the comparative stabilizing effects of sodium chloride and the acidic form of arginine (arginine-HCl) on CHIR-12.12 in an aqueous formulation.

 The CHIR-12.12 bulk antibody drug substance was formulated with a citrate buffer at pH 5.5, employing either 150 mM NaCl or 150 mM L-arginine-HCl to achieve the target osmolality of 295 mOsm/kg for the CHIR-12.12 liquid formulation. Differential Scanning Calorimetry (DSC), size-exclusion chromatograph (SEC-HPLC), SDS-PAGE, and Cation-Exchange HPLC (CEX-HPLC) were used to evaluate biophysical and/or biochemical stability of the CHIR-12.12 antibody. The study demonstrates that 150 mM L-arginine-HCl not only renders isotonicity to a

CHIR-12.12 aqueous formulation, but also increases the conformational stability of CHIR-12.12 against aggregation, fragmentation, and deamidation. L-arginine-HCl proved to be superior to NaCl under accelerated stability conditions. Furthermore, the accelerated stability data predict a longer shelf-life for the CHIR-12.12 L-arginine-HCl formulation.

Materials

The CHIR-12.12 drug substance (DS) used for this study was a CHO-derived purified bulk lot # CD021105A. The DS lot was produced at Xoma Ltd. (Berkeley, CA).

CHIR-12.12 from the DS lot was used in the following formulations:

Formulation 1: 20 mg/ml CHIR-12.12, 10 mM sodium citrate/citric acid, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 80, and pH 5.5

Formulation 2: 20 mg/ml CHIR-12.12, 10 mM sodium citrate/citric acid, 150 mM L-arginine-HCl, 0.1% Tween 80, and pH 5.5

Analytical Methods

Differential Scanning Calorimetry (DSC).

Conformational stability of the CHIR-12.12 formulation samples was evaluated using a MicroCal VP-DSC upon heating 15°C to 90°C at 1°C/min.

Size Exclusion Chromatography (SEC-HPLC).

Purity, aggregation, and fragmentation of CHIR-12.12 were analyzed by a Waters Alliance RPLC with a Tosohaas TSK-GEL 3000SW_{XL} column, 50 mM sodium, phosphate, 200 mM NaCl, pH 7.0 as mobile phase at a flow Rate of 0.7 ml/min.

SDS PAGE (Non-reduced and Reduced).

Purity of CHIR-12.12 was also evaluated using 12% Tris-Glycine gels under non-reducing and reducing conditions. The protein was detected by Coomassie blue staining.

Cation Exchange Chromatography (CEX-HPLC).

Charge change-related deamidation of CHIR-12.12 was measured using a Waters Alliance 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 0.8 ml/min.

The following is a key to the abbreviations in the figures referred to in the results section herein below:

Succinate, NaCl, 0.1% TW80	= 10 mM sodium succinate/succinic acid buffer, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 80, pH 5.5
Citrate, NaCl, 0.1% Tw80	= 10 mM sodium citrate/citric acid buffer, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 80, pH 5.5
Acetate, NaCl, 0.1% Tw80	= 10 mM sodium acetate/acetic acid buffer, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 80, pH 5.5
Phos, NaCl, 0.1% Tw80	= 10 mM sodium phosphate dibasic/sodium phosphate monobasic buffer, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 80, pH 5.5
Citrate, Arg, 0.1% Tw80	= 10 mM sodium citrate/citric acid buffer, 150 mM L-arginine-HCl, 0.1% Tween 80, pH 5.5

Results

Differential Scanning Calorimetry (DSC).

Figure 7 shows DSC theograms for CHIR 12.12 in the two formulations as described in the "Materials" section above. Thermal unfolding of CHIR-12.12 exhibited at least two thermal transitions, probably representing unfolding /melting of the Fab and the Fc domains, respectively. At higher temperature, the proteins presumably aggregated, resulting in loss of DSC signal. In this study, the lowest thermal transition temperature was defined as the melting temperature, T_m . The L-arginine-HCl-containing formulation exhibited a higher T_m than the NaCl-containing formulation, suggesting that L-arginine-HCl provides CHIR-12.12 with higher conformational stability than does NaCl.

SEC-HPLC Analysis.

After incubation at 5°C through 6 months, SEC-HPLC detected negligible amounts of protein aggregates and fragments (< 0.5%) in the L-arginine-HCl- and NaCl-containing formulations and no appreciable stability difference between the two formulations (data not shown). Under accelerated storage conditions, i.e., 25°C for 6

months, the L-arginine-HCl-containing formulation contained a higher percentage of monomer, as shown in Figure 8. At the expense of the monomer, the content of both aggregates and fragments slowly increased with storage time. However, the L-arginine-HCl-containing formulation generated less aggregates and fragments than the NaCl-containing formulation as shown in Figure 9 and 10, respectively. Similarly, when stored at 40°C, the L-arginine-HCl-containing formulation exhibited a higher percentage of monomer and lower percentages of aggregates and fragments than did the NaCl-containing formulation, as shown in Figure 11, 12, and 13, respectively. Upon storage at 40°C for 4 months, the L-arginine-HCl-containing formulation had 91.8 % monomer remaining, 1.7 % aggregates, and 6.5 % fragments, while the NaCl-containing formulation had 87.9 % monomer, 2.2 % aggregates, and 9.9 % fragments. The SEC-HPLC results demonstrate L-arginine-HCl improves the stability of CHIR-12.12 protein in comparison with NaCl.

SDS-PAGE (Non-reduced and Reduced).

Table 3 presents SDS-PAGE results for the L-arginine-HCl- and NaCl-containing formulations analyzed under non-reduced (NR) and reduced (R) conditions. The purity of CHIR-12.12 was measured as a percentage of the main band under non-reduced conditions or as a percentage of the sum of the heavy and light chain bands under reduced conditions. Except at time 0, the L-arginine-HCl-containing formulation showed higher purity than did the NaCl-containing formulation under both non-reduced and reduced conditions. The observation from SDS-PAGE was consistent with SEC-HPLC results in that L-arginine-HCl increased the stability of CHIR-12.12 over NaCl.

Table 3. Comparison of L-arginine-HCl and NaCl by SDS-PAGE analysis.

Formulation with 20 mg/ml CHIR-12.12	T=0		4 mo at 25°C		4 mo at 40°C		6 mo at 25°C	
	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR
	%	%	%	%	%	%	%	%
	H+L	Main	H+L	Main	H+L	Main	H+L	Main
Citrate, NaCl, 0.1% Tween 80, pH 5.5	98.6	85.0	97.2	82.5	91.1	72.1	96.6	76.2
Citrate, L-arg-HCl, 0.1% Tween 80, pH 5.5	98.8	85.0	97.4	83.1	91.3	76.2	97.6	78.9

CIEX-HPLC Analysis.

CIEX-HPLC separates molecules based on charge so that the acidic variants elute before the main peak species and the basic variants elute after the main peak species. The purity of CHIR-12.12 and its deamidation products content were measured as percentage of main peak and percentage of acidic variants, respectively.

Figure 14, 15, and 16 show the purity, the content of deamidation product, and the content of basic variants, respectively, in the two formulations. At time 0, the two formulations had 68.6 % purity and 15.5% deamidation product as well as 15.9 % basic variants. When stored at 25°C, the L-arginine-HCl-containing formulation remained at higher purity and at higher content of basic variants, and exhibited a lower percentage of deamidation products than the NaCl-containing formulation. Upon storage at 25°C for 6 months, the L-arginine-HCl-containing formulation had 47.3 % purity, 12.5 % basic variants, and 40.0 % deamidation product generated, while the NaCl-containing formulation had 45.6 % purity, 11.7% basic variants, and 42.7 % deamidation product. Although the L-arginine-HCl- and NaCl-containing formulations showed little change throughout 6 months storage at 5°C, the CIEX-HPLC results under accelerated storage conditions (25°C) predict that L-arginine-HCl will likely be superior to NaCl in improving the long-term real-time stability of CHIR-12.12 against deamidation.

In summary, this study demonstrates that 150 mM L-arginine-HCl not only renders isotonicity to the CHIR-12.12 liquid formulation, but also increases the conformational stability of CHIR-12.12 against aggregation, fragmentation, and deamidation. L-arginine-HCl is superior to NaCl under accelerated stability conditions, and the accelerated stability data further predict a longer shelf-life for the CHIR-12.12 L-arginine-HCl formulation.

Example 3: Effects of Tween 80 and Tween 20 in Minimizing Aggregation of CHIR-12.12 Bulk Drug Substance from Frozen Storage

Frozen storage of the CHIR-12.12 bulk drug substance is preferred over liquid storage for several reasons including increased product stability and shelf life, decreased microbial growth, as well as elimination of foaming during transport. However, freezing and subsequent thawing can induce stresses in protein solution by introducing ice-liquid interfaces and concentration gradient of solutes. The stresses

000000

may denature proteins and lead to aggregation and, in worse cases, formation of visible particulates or precipitates. As protein aggregates have been frequently associated with reduced drug potency and increased immunogenicity, minimizing aggregation by optimizing protein formulation components and freeze-thaw conditions is very critical.

Formulation excipients, such as sugars, polyhydric alcohols, amino acids, and surfactants can possibly stabilize proteins and antibodies from aggregation. In one monoclonal antibody study, a few commonly used sugars, polyhydric alcohols, and amino acids were found to be more effective than surfactants in reducing freeze-thaw triggered aggregation. However, earlier studies with CHIR-12.12 showed that the use of a sugar (e.g., trehalose), a polyhydric alcohol (e.g., sorbitol), or an amino acid (e.g. glycine) alone could not significantly reduce aggregation of CHIR-12.12 during freezing and thawing.

This study focused on formulation approaches to minimize aggregation of CHIR-12.12 during freezing and thawing. In this manner, various surfactants were evaluated in order to minimize the freeze-thaw-induced aggregation of CHIR-12.12. Although it is unlikely that the actual frozen CHIR-12.12 drug substance would experience multiple freeze-thaw cycling as evaluated in this study, extensive freeze-thaw stressing studies are worst-case scenario evaluations used to predict the potential for the formulated bulk drug to aggregate should multiple freezing and thawing inadvertently occur during long-term storage and transportation.

Materials

CHIR-12.12 bulk DS lots # UA7870, # TC23-2, # UB 1291, # PD010705A, and #CD083005A were used for this study. Tween 80, Tween 20, Brij 35, and Pluronic F68 were purchased from Sigma, J.T. Baker, Alfa Aesar, and MediaTech Cellgro, respectively. The polycarbonate (PC) bottle for frozen storage of CHIR-12.12 drug substance was purchased from Nalgene.

Methods

Except for the control samples, all other samples were subjected to complete freezing at -20°C or -60°C followed by complete thawing at ambient temperature for multiple cycles.

Three analytical methods were employed to detect CHIR-12.12 protein ranging from monomer to visible aggregates. Visual observation was performed under Tyndal light (M.W. Technologies, Inc.) for detecting visible particulates. Liquid Particle Counting System (HIAC/Royco) was used to count sub-visible aggregates $\geq$ 10 μm and $\geq$ 25 μm . Dynamic Light Scattering Analyzer (Malvern Nano Series) was employed to determine hydrodynamic diameters of monomer and aggregates and the particle size distribution.

Visible Particle Evaluation.

The samples for the freeze-thaw study were prepared from CHIR-12.12 drug substance lot #UA7870 and lot # TC23-2. All samples were formulated in 10 mM sodium citrate/citric acid, 150 mM NaCl, and pH 5.5 buffer solution by dialysis, followed by the addition of varying percentages (0-0.5% w/v) of one of the following nonionic surfactants: Tween 80, Tween 20, Brij 35, and Pluronic F68. Each sample of 2.5 ml was filled into glass vials and subjected to overnight freezing at -60°C and complete thawing at ambient temperature for up to eight cycles. The samples at initial time (time 0) and after each freeze-thaw cycle were visually examined for clarity and visible precipitates/aggregates.

Sub-Visible Particle Count.

CHIR-12.12 drug substance lot # UB 1291 and # PD010705A were formulated in the solution (20 mg/ml CHIR-12.12, 10 mM sodium citrate/citric acid, 150 mM NaCl, at pH 5.5), followed by the addition of 0-0.5% (w/v) of Tween 80 or Tween 20. Aliquots of 20-ml formulation samples were filled into 125 cc polycarbonate bottles and subjected to freezing at -60°C and thawing at ambient temperature. After five cycles of freeze-thaw, the samples were measured for sub-visible aggregates $\geq$ 10 μm and $\geq$ 25 μm using HIAC-Royco Liquid Particle Counting System.

Dynamic Light Scattering Analysis.

Prior to and post 5 cycles of freeze-thaw, the formulations (20 mg/ml CHIR-12.12, 10 mM sodium citrate/citric acid, 150 mM L-arginine-HCl, 5 mM L-

methionine, 0-0.2% Tween 20, and pH 5.5) were evaluated for aggregates using Dynamic Light Scattering Analyzer.

Dynamic Light Scattering (DLS) spectroscopy calculates the hydrodynamic diameter of particles including monomer and aggregates from the measured diffusion coefficient of the particles using the Stokes-Einstein equation and the assumption that the particles are spherical. The number of aggregates species and polydispersity are also obtained from DLS studies.

Results

Visible Particle Evaluation.

Table 4 summarizes the results of the visual observation. At time 0, which was prior to initiating the freeze-thaw cycles, all the samples were slightly opalescent without visible aggregates/precipitates. After one freeze-thaw cycle, a few visible aggregates/precipitates formed in all the formulations without any added surfactant, and in the formulations containing 0-0.05% (w/v) of Tween 80 and in the formulations containing 0-0.1% (w/v) Brij 35 as well as in the samples containing 0-0.5% (w/v) Pluronic F68. The samples containing 0.05%-0.5% (w/v) Tween 20 did not show any aggregates or precipitates throughout the eight cycles of freeze-thaw. This suggests Tween 20 is more effective than Tween 80 in preventing the formation of large insoluble aggregates from multiple freeze-thaw cycles. Brij 35 and Pluronic F68 were much less effective than Tween 80 and Tween 20.

Table 4. Visual appearance of CHIR-12.12 in the citrate-buffered formulations with varying concentrations of surfactant.

Formulation 20 mg/ml CHIR-12.12, 10 mM Citrate/Citric Acid, 150 mM NaCl, Tween 80, pH 5.5							
Tween 80 Conc. (w/v)	T=0	1XFT*	2XFT	4XFT	5XFT	6XFT	8XFT
0%	SO	SO, a few ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt
0.05%	SO	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt
0.10%	SO	SO	SO	SO, a few	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, a few ppt
0.20%	SO	SO	SO	SO	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, a few ppt
0.50%	SO	SO	SO	SO	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, a few ppt
Formulation 20 mg/ml CHIR-12.12, 10 mM Citrate/Citric Acid, 150 mM NaCl, Tween 20, pH 5.5							
Tween 20 Conc. (w/v)	T=0	1XFT	2XFT	4XFT	5XFT	6XFT	8XFT
0%	SO	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt
0.01%	SO	SO	SO	SO	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, ppt
0.05%	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO
0.10%	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO
0.20%	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO
0.50%	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO
Formulation 20 mg/ml CHIR-12.12, 10 mM Citrate/Citric Acid, 150 mM NaCl, Brij 35, pH 5.5							
Brij 35 Conc. (w/v)	T=0	1XFT	2XFT	4XFT	5XFT	6XFT	8XFT
0%	SO	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt
0.01%	SO	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, a few ppt
0.10%	SO	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, a few ppt
0.20%	SO	SO	SO	SO	SO	SO, a few ppt	SO, a few ppt
0.50%	SO	SO	SO	SO	SO	SO, a few ppt	SO, a few ppt
Formulation 20 mg/ml CHIR-12.12, 10 mM Citrate/Citric Acid, 150 mM NaCl, Pluronic F68, pH 5.5							
Plur. F68 Conc. (w/v)	T=0	1XFT	2XFT	4XFT	5XFT	6XFT	8XFT
0%	SO	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt
0.01%	SO	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, a few ppt
0.10%	SO	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, a few ppt
0.20%	SO	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, a few ppt
0.50%	SO	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, a few ppt	SO, a few ppt

Keys: XFT= no. of freeze-thaw cycles; SO = slightly opalescent; ppt = precipitate/aggregate

Sub-Visible Particle Count.

Table 5 shows the sub-visible aggregates counts per ml of citrate/citric acid-buffered formulations containing varying concentrations of Tween 80. A downward trend in the sub-visible particle counts was observed as the Tween 80 concentration increased; the decrease in the sub-visible particle counts was modest when Tween 80 was above 0.1% (w/v), suggesting the appropriate concentration for the use of Tween 80 was 0.1-0.2% (w/v).

Table 5. Sub-visible particle counts in the formulations containing 20mg/ml CHIR-12.12, 10 mM sodium citrate/citric acid, 150 mM NaCl, and varying concentrations (0-0.2% w/v) of Tween 80 at pH 5.5.

Concentration of Tween 80 (w/v)	Sub-Visible Particle Counts /ml after 5 Freeze-Thaw Cycles	
	$\geq 10 \mu\text{m}$	$\geq 25 \mu\text{m}$
0% Tween 80	1439	23
0.05% Tween 80	148	3
0.10% Tween 80	44	1
0.20% Tween 80	39	1

Table 6 shows the sub-visible aggregates counts per ml of the citrate/citric acid-buffered formulations with or without Tween 20. The aggregate counts were greatly reduced with addition of Tween 20 in the formulation. When Tween 20 was 0.05% (w/v) and above, the decrease in the sub-visible aggregates counts almost reached a plateau, suggesting the appropriate concentration of Tween 20 was around 0.05-0.2% (w/v).

Table 6. Sub-visible particle counts in the formulations containing 20mg/ml CHIR-12.12, 10 mM sodium citrate/citric acid, 150 mM NaCl, and varying concentrations (0-0.2% w/v) of Tween 20 at pH 5.5.

Concentration of Tween 20 (w/v)	Sub-Visible Particle Counts /ml after 5 Freeze-Thaw Cycles	
	$\geq 10 \mu\text{m}$	$\geq 10 \mu\text{m}$
0% Tween 20	1671	41
0.01% Tween 20	46	2
0.05% Tween 20	32	3
0.1% Tween 20	11	1
0.2% Tween 20	25	1

Additionally, Tables 5 and Table 6 show both Tween 80- and Tween 20-containing formulations generated very few aggregates $\geq 25 \mu\text{m}$, and the Tween 20-containing formulation generated fewer aggregates $\geq 10 \mu\text{m}$ than did the Tween 80-

00122

containing formulation after 5 cycles of freeze-thaw. The results indicate Tween 20 is more effective than Tween 80 in minimizing the formation of sub-visible aggregates in the CHIR-12.12 citrate/citric acid-buffered formulation.

Based on the results in Tables 4, 5, and 6, Tween-20 represents a preferred excipient over Tween 80 to minimize the formation of aggregates in CHIR-12.12 formulations. Accordingly, additional studies were conducted to further optimize the concentrations of Tween-20 needed to obviate the formation of aggregates in CHIR-12.12 formulations. The formulations (20 mg/ml CHIR-12.12, 10 mM sodium citrate/citric acid, 150 mM L-arginine-HCl, 5 mM L-methionine, 0-0.2% Tween 20, at pH 5.5) were prepared from CHIR-12.12 drug substance lot # CD083005A. 20 ml formulation samples were filled into 125 cc polycarbonate bottles and subjected to freezing at -20°C and thawing at ambient temperature. Prior to and post five freeze-thaw cycles, the formulation samples were measured for sub-visible particle counts using HIAC-Royco liquid particle counter. The results are summarized in Table 7.

Table 7. Sub-visible particle counts in the formulations containing 20 mg/ml CHIR-12.12, 10 mM sodium citrate/citric acid, 150 mM L-arginine-HCl, 5 mM L-methionine, 0-0.2% Tween 20, at pH 5.5.

Concentration of Tween 20 (w/v)	Particle Counts/ml $\geq 10 \mu\text{m}$		Particle Counts/ml $\geq 25 \mu\text{m}$	
	Prior to FT	Post 5XFT*	Prior to FT	Post 5XFT
0% Tween 20	23	169	7	5
0.005% Tween 20	4	24	0	2
0.025% Tween 20	5	6	1	1
0.05% Tween 20	2	9	0	1
0.1% Tween 20	6	7	1	1
0.2% Tween 20	10	64	1	5

*Key: XFT = no. of freeze-thaw cycles.

After five cycles of freeze-thaw, the samples containing L-arginine-HCl and L-methionine generated much less aggregates than the formulation without L-arginine-HCl and L-methionine, i.e., 169 particles/ml $\geq 10 \mu\text{m}$ versus 1439 or 1671 particles/ml $\geq 10 \mu\text{m}$ in the absence of Tween 20 (see Tables 6 and 7). However, until Tween 20 was introduced, L-arginine-HCl and L-methionine did not significantly reduce the freeze-thaw-induced aggregates to a minimum level. This suggests that L-arginine-HCl and L-methionine are not sufficiently effective in minimizing freeze-thaw-induced aggregation of CHIR-12.12.

From the data summarized in Tables 5-7, the sub-visible aggregates counts of freeze-thawed samples containing 0.025-0.1% (w/v) Tween 20 remained comparable to the respective samples prior to freeze-thaw cycling. This indicates that

00123

formulations containing Tween 20 in combination with L-arginine-HCl and L-methionine generated minimum sub-visible aggregates. Thus, Tween 20 is the excipient in the formulation that effectively minimizes CHIR-12.12 from generating sub-visible aggregates during freezing and thawing. The effective concentration of Tween 20 was determined to be 0.025-0.1 % (w/v).

Dynamic Light Scattering Analysis.

Table 8 shows the mean hydrodynamic diameter of the particles, polydispersity, and percent intensity of the monomer species of CHIR-12.12. The Dynamic Light Scattering analysis detected only monomer species in all the samples prior to and post five cycles of freeze-thaw, as shown by 100% intensity of the monomer species. This suggests all the samples were mainly composed of monomers. After 5 cycles of freeze-thaw studies, a few aggregates (possibly dimer or trimer) might coexist with the monomer in the samples without Tween 20 and with 0.005% (w/v) Tween 20, as shown by the increases in hydrodynamic diameter and polydispersity. The samples containing 0.025-0.1% (w/v) Tween 20 showed little change in hydrodynamic diameter and the polydispersity values, indicating they remained at the previous levels of monomers without appreciable aggregate formation.

Table 8. Dynamic Light Scattering analysis of CHIR-12.12 before and after five cycles of freeze-thaw of the formulation containing 20 mg/ml CHIR-12.12, 10 mM sodium citrate/citric acid, 150 mM L-arginine-HCl, 5 mM L-methionine, and varying concentrations (0-0.2%) of Tween 20, at pH 5.5)

Concentration of Tween 20 (w/v)	Mean Hydrodynamic Diameter (nm)		Polydispersity		Intensity % of Monomer Species	
	Prior to FT*	Post 5XFT*	Prior to FT	Post 5XFT	Prior to FT	Post 5XFT
0% Tween 20	12.2	12.4	0.047	0.055	100.0	100.0
0.005% Tween 20	12.2	12.4	0.045	0.045	100.0	100.0
0.025% Tween 20	12.3	12.4	0.035	0.034	100.0	100.0
0.05% Tween 20	12.3	12.2	0.035	0.031	100.0	100.0
0.1% Tween 20	12.4	12.4	0.035	0.039	100.0	100.0
0.2% Tween 20	12.3	12.2	0.036	0.043	100.0	100.0

*Key: FT = freeze-thaw; XFT = no. of freeze-thaw cycles.

Based on the visual observation, sub-visible particle counts, and the Dynamic Light Scattering analysis, the optimum concentration of Tween 20 was determined to be 0.025-0.1% (w/v) for minimizing CHIR-12.12 from freeze-thaw-induced aggregation.

In summary, both Tween 20 and Tween 80 have been found to minimize CHIR-12.12 aggregation during freezing and thawing. The optimum concentrations of Tween 20 and Tween 80 are 0.025-0.1% (w/v) and 0.1-0.2 (w/v) %, respectively. Tween 20 is more effective than Tween 80 in that a lower concentration of Tween 20 reduces the number and extent of the formation of aggregates to a lower level. This study has demonstrated that the addition of an optimum concentration of Tween, preferably in combination with L-arginine-HCl and L-methionine, enables the storage of the citrate/citric acid-buffered CHIR-12.12 bulk drug substance at -20°C or below without significant aggregation.

Example 4: Assays for Antagonist Activity of Anti-CD40 Antibodies

The following assays can be used to assess the antagonist activity of an anti-CD40 antibody. Human B cells for these assays can be obtained, for example, by isolation from tonsils obtained from individuals undergoing tonsillectomies, essentially as described in De Groot *et al.* (1990) *Lymphokine Research* (1990) 9:321. Briefly, the tissue is dispersed with scalpel blades, phagocytic and NK cells are depleted by treatment with 5 mM L-leucine methyl ester and T cells are removed by one cycle of rosetting with sheep erythrocytes (SRBC) treated with 2-aminoethyl isothiuronium bromide. The purity of the resulting B lymphocyte preparations can be checked by indirect immunofluorescent labelling with anti-(CD20) mAb B1 (Coulter Clone, Hialeah, FA) or anti-(CD3) mAb OKT3 (Ortho, Raritan, NJ) and a FITC-conjugated F(ab')₂ fragment of rabbit anti-(mouse Ig) (Zymed, San Francisco, CA), and FACS analysis.

B-Cell Proliferation Assay.

B cells (4×10^4 per well) are cultured in 200 μ l IMDM supplemented with 10% fetal calf serum in flat bottom 96-well microtiter plates. B cells are stimulated by addition of immobilized anti-(IgM) antibodies (Immunobeads; 5 μ g/ml; BioRad, Richmond, California). Where desired, 100 U/ml recombinant IL-2 is added. Varying concentrations of test monoclonal antibodies (mAbs) are added at the onset of the microcultures and proliferation is assessed at day 3 by measurement of the incorporation of (³H)-thymidine after 18 hour pulsing.

00125

An antagonist anti-CD40 antibody does not significantly costimulate human B-cell proliferation in the presence of immobilized anti-IgM or in the presence of immobilized anti-IgM and IL-2.

5 *Banchereau-Like B-Cell Proliferation Assay.*

For testing the ability of anti-CD40 monoclonal antibodies to stimulate B-cell proliferation in a culture system analogous to that described by Banchereau *et al.* (1991) *Science* (1991) 251:70, mouse 3T6 transfectant cells expressing the HR allelic form of human FcγRII are used. B cells (2×10^4 per well) are cultured in flat-bottom
10 microwells in the presence of 1×10^4 transfectant cells (irradiated with 5000 Rad) in 200 μl IMDM supplemented with 10% fetal calf serum and 100 U/ml recombinant IL-4. Before addition of the B cells, the 3T6 cells are allowed to adhere to the culture plastic for at least 5 hours. Anti-CD40 mAbs are added at concentrations varying from 15 ng/ml to 2000 ng/ml and proliferation of B cells is assessed by measurement
15 of thymidine incorporation at day 7, upon 18 hour pulsing with [^{3} H] thymidine.

Inhibition of S2C6-Stimulated B-Cell Proliferation Using Antagonist Anti-CD40 mAbs.

Antagonist anti-CD40 monoclonal antibodies (mAbs) can also be
20 characterized by their ability to inhibit stimulation of B-cell proliferation by an anti-CD40 antibody such as S2C6 (also known as SGN-14, which is reportedly an agonist of CD40 stimulation of proliferation of normal B cells; Francisco *et al.* (2000) *Cancer Res.* 60:3225-3231) using the B-cell Proliferation Assay described above. Human tonsillar B cells (4×10^4 per well) are cultured in 200 μl in microwells in the presence
25 of anti-IgM coupled to Sepharose beads (5 μg/ml) and anti-CD40 mAb S2C6 (1.25 μg/ml). Varying concentrations of an anti-CD40 mAb of interest are added and [^{3} H]-thymidine incorporation is assessed after 3 days. As a control anti-(glucocerebrosidase) mAb 8E4 can be added in similar concentrations. Barneveld *et al.* (1983) *Eur. J. Biochem.* 134:585. An antagonist anti-CD40 antibody can inhibit
30 the costimulation of anti-IgM induced human B-cell proliferation by mAb S2C6, for example, by at least 75% or more (i.e., S2C6-stimulated proliferation in the presence of an antagonist anti-CD40 antibody is no more than 25% of that observed in the absence of the antagonist anti-CD40 antibody). In contrast, no significant inhibition

would be seen with equivalent amounts of non-relevant mAb 8E4, directed to β -glucocerebrosidase. Barneveld *et al.*, *supra*. Such a result would indicate that the anti-CD40 mAbs does not deliver stimulatory signals for the proliferation of human B cells, but, conversely, can inhibit stimulatory signals exerted by triggering CD40 with another mAb.

B-Cell Activation Assay with EL4B5 Cells.

Zubler *et al.* (1985) *J. Immunol.* (1985) 134:3662 observed that a mutant subclone of the mouse thymoma EL-4 line, known as EL4B5, could strongly stimulate B cells of both murine and human origin to proliferate and differentiate into immunoglobulin-secreting plasma cells *in vitro*. This activation was found to be antigen-independent and not MHC restricted. For optimal stimulation of human B cells, the presence of supernatant from activated human T cells was needed but a B-cell response also occurred when EL4B5 cells were preactivated with phorbol-12-myristate 13-acetate (PMA) or IL-1. Zubler *et al.* (1987) *Immunological Reviews* 99:281; and Zhang *et al.* (1990) *J. Immunol.* 144:2955. B-cell activation in this culture system is efficient — limiting dilution experiments have shown that the majority of human B cells can be activated to proliferate and differentiate into antibody-secreting cells. Wen *et al.* (1987) *Eur. J. Immunol.* 17:887.

B cells (1000 per well) are cultured together with irradiated (5000 Rad) EL4B5 cells (5×10^4 per well) in flat bottom microtiter plates in 200 μ l IMDM supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 5 ng/ml phorbol-12-myristate 13-acetate (Sigma) and 5% human T-cell supernatant. mAbs are added at varying concentrations at the onset of the cultures and thymidine incorporation is assessed at day 6 after 18 hour pulsing with [^{3} H]-thymidine. For the preparation of T-cell supernatant, purified T cells are cultured at a density of 10^6 /ml for 36 hours in the presence of 1 μ g/ml PHA and 10 ng/ml PMA. Wen *et al.* (1987) *Eur. J. Immunol.* (1987) 17:887. T-cell supernatant is obtained by centrifugation of the cells and stored at -20°C. The effectiveness of T-cell supernatants in enhancing proliferation of human B cells in EL4B5-B cell cultures is tested and the most effective supernatants are pooled for use in experiments. When assessing the effect of an anti-CD40 antibody on EL4B5-induced human B-cell proliferation, a monoclonal antibody such as MOPC-141 (IgG2b) can be added as a control.

An antagonist anti-CD40 antibody can inhibit B-cell proliferation stimulated by the EL4B5 cell line, for example, by at least 75% or more (i.e., EL4B5-induced B cell proliferation in the presence of an antagonist anti-CD40 antibody is no more than 25% of that observed in the absence of the antagonist anti-CD40 antibody). In contrast, a control antibody such as MOPC-141 would have no significant effect on EL4B5-induced B cell proliferation.

Human T Cell Helper Assay for Antibody Production by B Cells.

An antagonist anti-CD40 antibody can function as an antagonist of immunoglobulin production by B cells. An anti-CD40 antibody can be tested for this type of antagonist activity by assessing the antibody's ability to inhibit immunoglobulin production by B cells that have been stimulated in a contact-dependent manner with activated T cells in a T cell helper assay. In this manner, 96-well tissue culture plates are coated with a 1:500 dilution of ascites fluid of anti-CD3 mAb CLB-T3/3 (CLB, Amsterdam, The Netherlands). As indicated costimulatory mAbs are added: anti CD2 mAbs CLB-T11.1/1 and CLB-T11.2/1 (CLB, Amsterdam, The Netherlands), both ascites 1:1000 and anti-CD28 mAb CLB-28/1 (CLB, Amsterdam, The Netherlands). Subsequently, tonsillar T cells (irradiated, 3000 Rad; 10^5 per well), tonsillar B cells (10^4 per well), and rIL-2 (20 U/ml) are added. The final volume of each cell culture is 200 μ l. After 8 days, cells are spun down, and cell-free supernatant is harvested. The concentrations of human IgM and IgG in (diluted) samples is estimated by ELISA as described below.

In one embodiment, human tonsillar B cells (10^4 /well) are cultured together with irradiated purified T cells (3000 rad, 10^5 /well) in 96-well plates, coated with anti-CD3 mAb and with or without different mAbs to costimulate the T cells. After 8 days of culture the supernatants are harvested for the determination of immunoglobulin production by the B cells. Immunoglobulin production by the B cells is assessed by the ELISA assay described below. The anti-CD40 antibody of interest is added in varying concentrations from the onset of the cultures. As a control, mAb MOPC-141 can be added.

An antagonist anti-CD40 antibody can inhibit IgG and IgM antibody production of B cells stimulated by human T cells by at least 50% or more (i.e., T cell-induced antibody production by B cells in the presence of an antagonist anti-

00128

CD40 antibody is no more than 50% of that observed in the absence of the antagonist anti-CD40 antibody). In contrast, a control antibody such as MOPC-141 would have no significant effect on T cell-induced antibody production by B cells.

5 *ELISA Assay for Immunoglobulin Quantification.*

The concentrations of human IgM and IgG are estimated by ELISA. 96-well ELISA plates are coated with 4 µg/ml mouse anti-human IgG mAb MH 16-01 (CLB, Amsterdam, The Netherlands) or with 1.2 µg/ml mouse anti-human IgM mAb 4102 (Tago, Burlingame, CA) in 0.05 M carbonate buffer (pH = 9.6), by incubation for 16
10 h at 4°C. Plates are washed 3 times with PBS-0.05% Tween-20 (PBS-Tween) and saturated with BSA for 1 hour. After 2 washes the plates are incubated for 1 h at 37°C with different dilutions of the test samples. After 3 washes, bound Ig is detected by incubation for 1 h at 37°C with 1 µg/ml peroxidase-labeled mouse anti-human IgG mAb MH 16-01 (CLB) or mouse anti-human IgM mAb MH 15-01 (CLB). Plates are
15 washed 4 times and bound peroxidase activity is revealed by the addition of O-phenylenediamine as a substrate. Human standard serum (H00, CLB) is used to establish a standard curve for each assay.

The article “a” and “an” are used herein to refer to one or more than one (i.e.,
20 to at least one) of the grammatical object of the article. By way of example, “an element” means one or more element.

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
25 extent as if each individual publication or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity of understanding, it will be obvious that certain changes and modifications may be practiced within the scope of the
30 appended claims.

00123

Applicant's or agent's file reference	PP028228.0002(325023)	International application No. PCT/US2007/
--	-----------------------	--

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 40, line 5	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an	
Name of depository institution American Type Culture Collection	
Address of depository institution (including postal code and country) 10801 University Blvd. Manassas, Virginia 20110-2209 USA	
Date of deposit 17 September 2003	Accession Number PTA-5542
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an	
page 40, line 5; page 41, line 2	
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
☐ This sheet was received with the international application
Authorized officer

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

000340

Applicant's or agent's file reference	PP028228.0002(325023)	International application No. PCT/US2007/
--	-----------------------	--

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 40, line 5	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT	
Further deposits are identified on an	
Name of depository institution American Type Culture Collection	
Address of depository institution (including postal code and country) 10801 University Blvd. Manassas, Virginia 20110-2209 USA	
Date of deposit 17 September 2003	Accession Number PTA-5543
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
This information is continued on an	
page 40, line 5; page 41, line 2; page 67, line 17	
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	
☐ This sheet was received with the international application	
Authorized officer	

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

ATCC

10801 University Blvd • Manassas, VA 20108-2219 • Telephone: 703-363-2700 • FAX: 703-363-2746

**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)**Chiron Corporation
Attn: Karen Van Nott
4560 Horton Street
Emeryville, CA 94608

Deposited on Behalf of: Chiron Corporation

Identification Reference by Depositor:Mouse Hybridoma 151.2F8.5.9: CMCC#12047
Mouse Hybridoma 153.2E2D10D6.12.12: CMCC#12056**Patent Deposit Designation**PTA-5542
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 20108-2209 USA.

Signature of person having authority to represent ATCC:

Mario Harris
Mario Harris, Patent Specialist, ATCC Patent Depository

Date: October 2, 2003

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

THAT WHICH IS CLAIMED:

1. A stable liquid pharmaceutical composition comprising:
 - a) an antagonist anti-CD40 monoclonal antibody as a
5 therapeutically or prophylactically active component, wherein said monoclonal antibody is capable of specifically binding to a human CD40 antigen expressed on the surface of a human B cell, said monoclonal antibody being free of significant agonist activity when bound to the CD40 antigen expressed on the surface of said B cell;
 - b) an amount of arginine in its acidic form (arginine-HCl)
10 sufficient to render said composition near isotonic; and
 - c) a buffering agent to maintain the pH of said composition within a range from about pH 5.0 to about pH 7.0, wherein said buffering agent is a citrate/citric acid buffer.
- 15 2. The composition of claim 1, wherein said composition has an osmolality of about 240 mmol/kg to about 360 mmol/kg.
3. The composition of claim 1, wherein the concentration of said buffering agent is about 5 mM to about 100 mM.
20
4. The composition of claim 3, wherein the concentration of said buffering agent is about 5 mM to about 20 mM.
5. The composition of claim 4, wherein the concentration of said
25 buffering agent is about 10 mM.
6. The composition of anyone of claims 1 through 5, wherein said buffering agent is a sodium citrate/citric acid buffer.
- 30 7. The composition of claim 6, wherein said composition has a pH of about pH 5.5.

0001/3

8. The composition of claim 1, wherein said composition comprises arginine-HCl at a concentration of about 50 mM to about 200 mM.

5 9. The composition of claim 8, wherein said composition comprises arginine-HCl at a concentration of about 100 mM to about 175 mM.

10 10. The composition of claim 9, wherein said composition comprises arginine-HCl at a concentration of about 150 mM.

11. The composition of claim 8, wherein the concentration of said buffering agent is about 5 mM to about 20 mM.

12. The composition of claim 11, wherein said buffering agent is a sodium citrate/citric acid buffer, and wherein the concentration of said buffering agent is about 10 mM, and said composition has a pH of about pH 5.5.

13. The composition of claim 12, wherein said composition comprises arginine-HCl at a concentration of about 150 mM.

14. The composition of claim 1, further comprising a surfactant.

15. The composition of claim 14, wherein said surfactant is polysorbate 20.

16. The composition of claim 15, wherein said surfactant is polysorbate 20 at a concentration of about 0.001% to about 1.0% (w/v).

17. The composition of claim 16, wherein said composition comprises polysorbate 20 at a concentration of about 0.025% to about 0.1% (w/v).

18. The composition of claim 1 or claim 14, further comprising methionine in an amount sufficient to inhibit oxidation of at least one oxidizable amino acid residue in said anti-CD40 monoclonal antibody during storage of said composition.

19. The composition of claim 18, wherein said composition comprises methionine at a concentration of about 0.5 mM to about 20.0 mM.
- 5 20. The composition of claim 19, wherein said composition comprises methionine at a concentration of about 1.0 mM to about 20.0 mM.
21. The composition of claim 20, wherein said composition comprises methionine at a concentration of about 5.0 mM.
- 10 22. The composition of anyone of claims 1 through 21, wherein said antagonist anti-CD40 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
 - 15 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
 - 20 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
 - 25 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;
 - 30 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;

000123

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.

23. The composition of claim 22, 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 composition of anyone of claims 1 through 23, wherein said antagonist anti-CD40 monoclonal antibody is present in said composition at a concentration of about 0.1 mg/ml to about 50.0 mg/ml.

25. The composition of claim 24, wherein said antagonist anti-CD40 monoclonal antibody is present in said composition at a concentration of about 1.0 mg/ml to about 35.0 mg/ml.

26. The composition of claim 25, wherein said antagonist anti-CD40 monoclonal antibody is present in said composition at a concentration of about 10.0 mg/ml to about 35.0 mg/ml.

27. The composition of claim 1, wherein said composition is stable at a temperature of about 2°C to about 8°C for a period of at least 18 months.

00116

28. The composition of claim 1, wherein said composition is stable at about 25°C for a period of at least 3 months.

5 29. A stable liquid pharmaceutical composition comprising an antagonist anti-CD40 monoclonal antibody as a therapeutically or prophylactically active component, arginine in its acidic form (arginine-HCl) at a concentration of about 50 mM to about 200 mM, and a buffering agent to maintain the pH of said composition within a range from about pH 5.0 to about pH 7.0, wherein said buffering agent is
10 sodium citrate/citric acid buffer at a concentration of about 5 mM to about 20 mM, wherein said antagonist anti-CD40 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
15 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
20 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
25 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
30 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.

30. The composition 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.

31. The composition of claim 29, wherein said composition comprises arginine-HCl at a concentration of about 150 mM, and the buffering agent is sodium citrate/citric acid at a concentration of about 5 mM to about 20 mM, wherein said composition has a pH of about 5.0 to about 6.0 and an osmolality of about 250 mmol/kg to about 330 mmol/kg.

32. The composition of claim 29, wherein said composition further comprises methionine, polysorbate 20, or both methionine and polysorbate 20, wherein said methionine when present is present in said composition at a concentration of about 0.5 mM to about 20.0 mM, and wherein said polysorbate 20 when present is present in said composition at a concentration of about 0.025% to about 0.1% (w/v).

33. The composition of any one of claims 29 through 32, wherein said antagonist anti-CD40 monoclonal antibody is present in said composition at a concentration of about 10.0 mg/ml to about 35.0 mg/ml.

5 34. The composition of claim 33, wherein said antagonist anti-CD40 monoclonal antibody is the monoclonal antibody CHIR-5.9 or CHIR-12.12.

35. A method for treating a subject having a cancer or pre-malignant condition that is associated with CD40-expressing cells, said method comprising
10 administering a pharmaceutically effective amount of the pharmaceutical composition according to any one of claims 1 through 34.

36. The method of claim 35, wherein said cancer is characterized by neoplastic B cell growth.
15

37. The method of claim 36, wherein said cancer is selected from the group consisting of 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 lymphoblastic leukemia, Hodgkin's disease, plasmacytoma, follicular lymphoma, follicular small
20 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
25 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, Waldenstrom's Macroglobulinemia, mantle cell lymphoma, and heavy chain disease.

38. The method of claim 35, wherein said cancer is a non-B cell hematological malignancy.
30

39. The method of claim 38, wherein said malignancy is selected from the group consisting of acute leukemias, myeloblastic leukemias, acute myelocytic leukemias, promyelocytic leukemia, myelomonocytic leukemia, monocytic leukemia, erythroleukemia, chronic myelocytic leukemia, and polycythemia vera.

5

40. The method of claim 35, wherein said cancer is a solid tumor comprising neoplastic cells expressing CD40 antigen.

10

41. The method of claim 40, wherein said solid tumor is selected from the group consisting of lung carcinoma, breast carcinoma, ovarian carcinoma, skin carcinoma, colon carcinoma, urinary bladder carcinoma, liver carcinoma, gastric carcinoma, prostate cancer, renal cell carcinoma, nasopharyngeal carcinoma, squamous cell carcinoma, thyroid papillary carcinoma, cervical carcinoma, and sarcomas.

15

42. The method of claim 35, wherein said pre-malignant condition is monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS).

20

43. A method for treating a subject having an inflammatory disease or autoimmune disease that is associated with CD40-expressing cells, said method comprising administering a therapeutically effective amount of the pharmaceutical composition according to any one of claims 1 through 34.

25

30

44. The method of claim 43, wherein said inflammatory disease or autoimmune disease is selected from the group consisting of systemic lupus erythematosus (SLE), discoid lupus, lupus nephritis, sarcoidosis, juvenile arthritis, rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, Reiter's syndrome, ankylosing spondylitis, gouty arthritis, rejection of an organ or tissue transplant, graft versus host disease, multiple sclerosis, hyper IgE syndrome, polyarteritis nodosa, primary biliary cirrhosis, inflammatory bowel disease, Crohn's disease, celiac's disease (gluten-sensitive enteropathy), autoimmune hepatitis, pernicious anemia, autoimmune hemolytic anemia, psoriasis, scleroderma, myasthenia gravis, autoimmune thrombocytopenic purpura, autoimmune thyroiditis, Grave's disease, Hashimoto's thyroiditis, immune

complex disease, chronic fatigue immune dysfunction syndrome (CFIDS), polymyositis and dermatomyositis, cryoglobulinemia, thrombolytic, cardiomyopathy, pemphigus vulgaris, pulmonary interstitial fibrosis, sarcoidosis, Type I and Type II diabetes mellitus, type 1, 2, 3, and 4 delayed-type hypersensitivity, allergy or allergic disorders, asthma, Churg-Strauss syndrome (allergic granulomatosis), atopic dermatitis, allergic and irritant contact dermatitis, urticaria, IgE-mediated allergy, atherosclerosis, vasculitis, idiopathic inflammatory myopathies, hemolytic disease, Alzheimer's disease, and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy.

10 45. A method for increasing stability of an anti-CD40 monoclonal antibody in a liquid pharmaceutical composition, said method comprising formulating said composition by combining said anti-CD40 monoclonal antibody, an amount of arginine-HCl sufficient to render to said composition near isotonic, and a buffering agent to maintain the pH of said composition between about pH 5.0 and about pH 7.0, 15 wherein said buffering agent is a citrate/citric acid buffer.

 46. A method for preparing a liquid pharmaceutical composition comprising an anti-CD40 monoclonal antibody, said method comprising formulating said composition by combining said anti-CD40 monoclonal antibody, an amount of 20 arginine in its acidic form (arginine-HCl) sufficient to render to said composition near isotonic, and a buffering agent to maintain the pH of said composition between about pH 5.0 and about pH 7.0, wherein said buffering agent is a citrate/citric acid buffer.

 47. The method of claim 45 or 46, wherein said composition has an 25 osmolality of about 240 mmol/kg to about 360 mmol/kg.

 48. The method of claim 45 or 46, wherein the concentration of said buffering agent is about 5 mM to about 100 mM, and about 50 mM to about 200 mM arginine-HCl is combined with said anti-CD40 monoclonal antibody and said 30 buffering agent.

00151

49. The method of claim 48, wherein the concentration of said buffering agent is about 5 mM to about 20 mM, and about 100 mM to about 175 mM arginine-HCl is combined with said anti-CD40 monoclonal antibody and said buffering agent.

5 50. The method of claim 49, wherein the concentration of said buffering agent is about 10 mM, and about 150 mM arginine-HCl is combined with said anti-CD40 monoclonal antibody and said buffering agent.

10 51. The method of anyone of claims 45 through 50, wherein said buffering agent is a sodium citrate/citric acid buffer.

52. The method of claim 51, wherein said composition has a pH of about pH 5.5.

15 53. The method of claim 45 or 46, wherein said composition is formulated to further comprise methionine, polysorbate 20, or both methionine and polysorbate 20, wherein said methionine when present is present in said composition at a concentration of about 0.5 mM to about 20.0 mM, and wherein said polysorbate 20 when present is present in said composition at a concentration of about 0.025% to
20 about 0.1% (w/v).

54. The method of any one of claims 45 through 53, wherein said antagonist anti-CD40 monoclonal antibody is selected from the group consisting of:

- 25 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
30 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;

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;

10 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;

15 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

20 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.

25 55. The method of claim 54, 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.

30 56. The method of anyone of claims 45 through 55, wherein said antagonist anti-CD40 monoclonal antibody is present in said composition at a concentration of about 0.1 mg/ml to about 50.0 mg/ml.

57. The method of claim 56, wherein said antagonist anti-CD40 monoclonal antibody is present in said composition at a concentration of about 10.0 mg/ml to about 35.0 mg/ml.

5 58. A stable liquid pharmaceutical composition comprising the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding fragment thereof, as a therapeutically or prophylactically active component, arginine in its acidic form (arginine-HCl) at a concentration of about 50 mM to about 200 mM, and a buffering agent to maintain the pH of said composition within a range from about pH 5.0 to
10 about pH 7.0, wherein said buffering agent is sodium citrate/citric acid buffer at a concentration of about 5 mM to about 20 mM.

59. A method for treating a subject having a cancer or pre-malignant condition that is associated with CD40-expressing cells, said method comprising
15 administering a pharmaceutically effective amount of the pharmaceutical composition of claim 58.

60. A method for treating a subject having an inflammatory disease or autoimmune disease that is associated with CD40-expressing cells, said method
20 comprising administering a therapeutically effective amount of the pharmaceutical composition of claim 58.

61. A method for increasing stability of the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding fragment thereof, in a liquid pharmaceutical composition, said method comprising formulating said composition by combining
25 said monoclonal antibody or antigen-binding fragment thereof with about 50 mM to about 200 mM arginine in its acidic form (arginine-HCl) and a buffering agent to maintain the pH of said composition between about pH 5.0 and about pH 7.0, wherein said buffering agent is sodium citrate/citric acid buffer at a concentration of about 5
30 mM to about 20 mM.

62. A method for preparing a liquid pharmaceutical composition comprising the monoclonal antibody CHIR-12.12 or CHIR-5.9, or antigen-binding

fragment thereof, said method comprising formulating said composition by
combining said monoclonal antibody or antigen-binding fragment thereof with about
50 mM to about 200 mM arginine in its acidic form (arginine-HCl) and a buffering
agent to maintain the pH of said composition between about pH 5.0 and about pH 7.0,
5 wherein said buffering agent is sodium citrate/citric acid buffer at a concentration of
about 5 mM to about 20 mM.

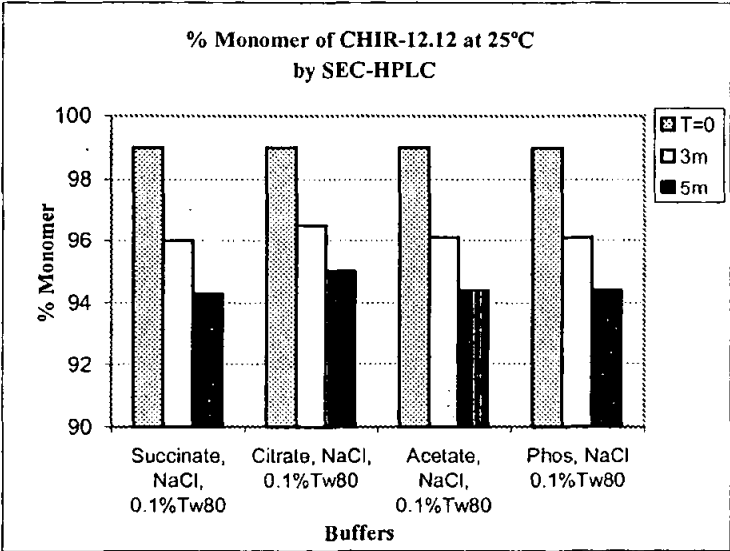


FIGURE 1

00150

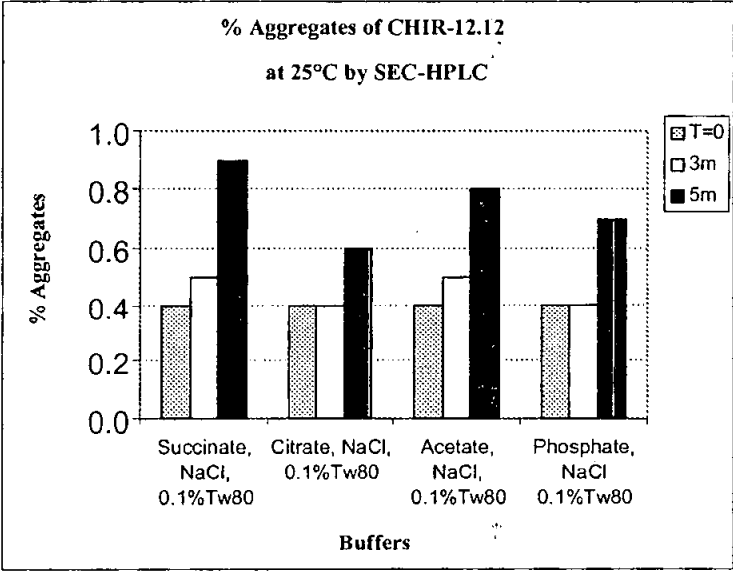


FIGURE 2

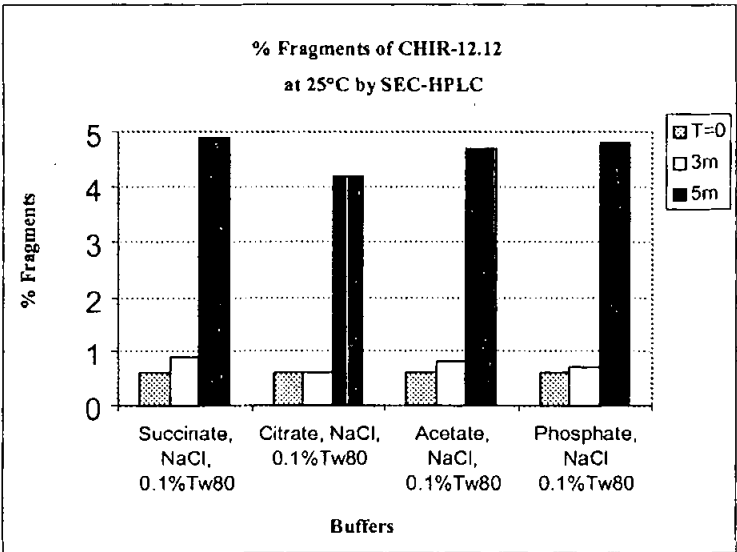


FIGURE 3

00158

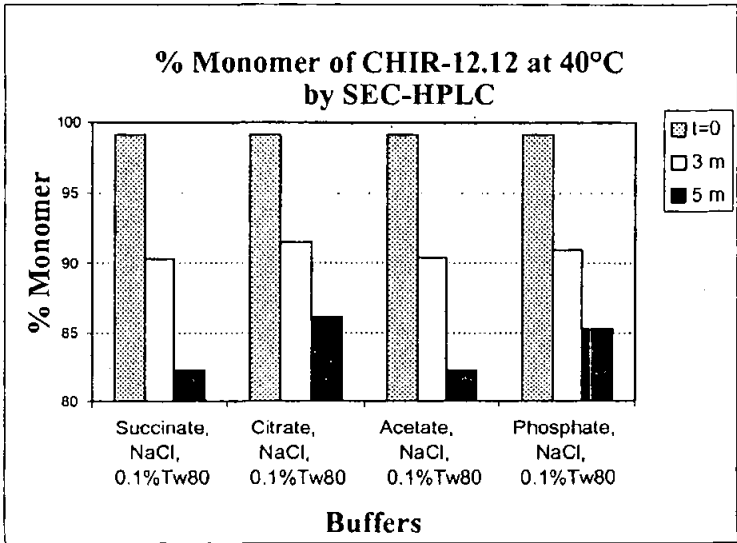


FIGURE 4

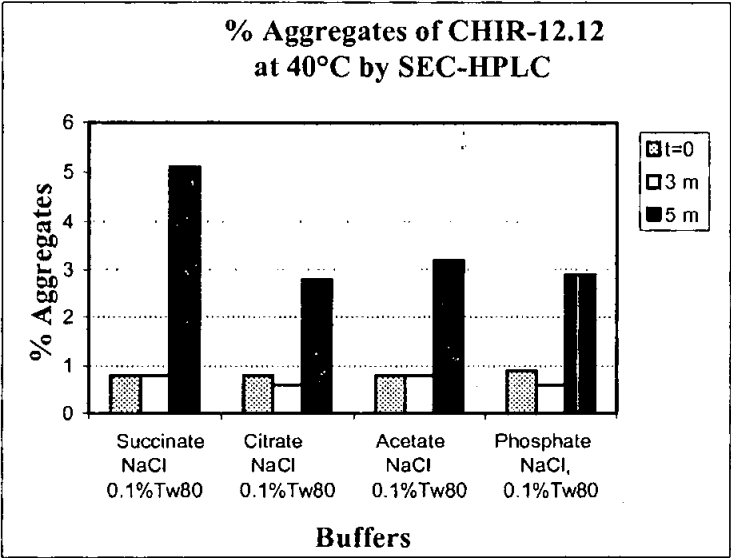


FIGURE 5

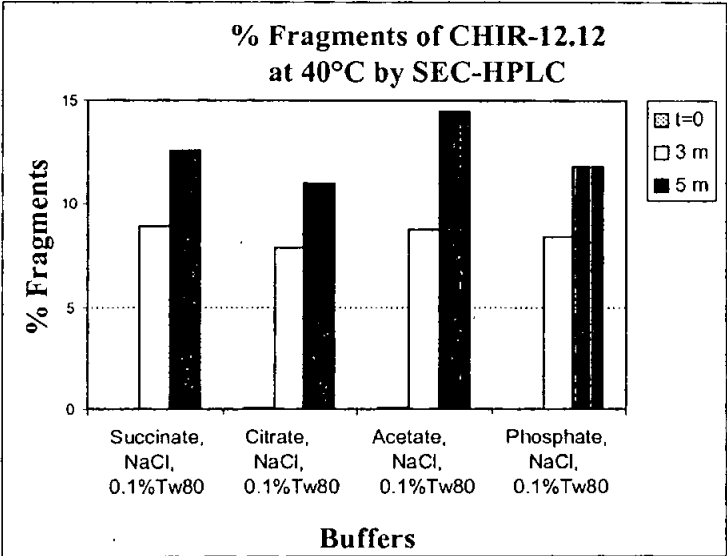


FIGURE 6

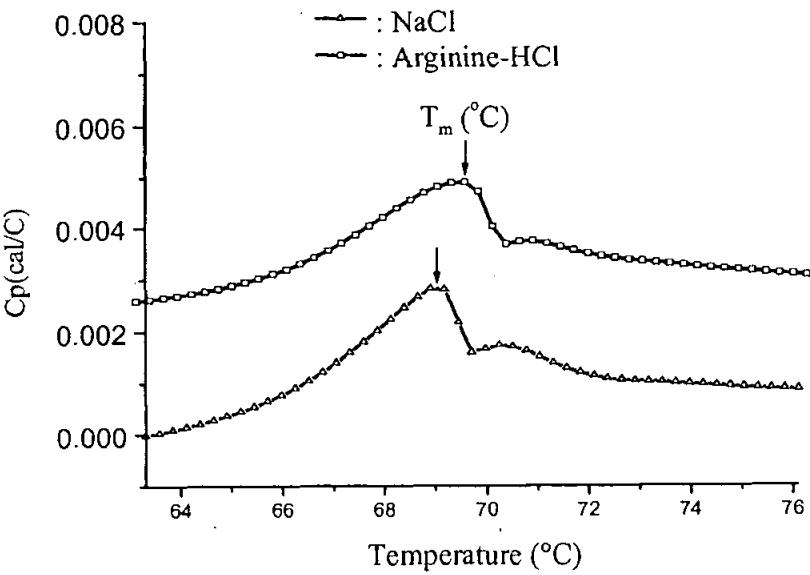


FIGURE 7

nn, 62

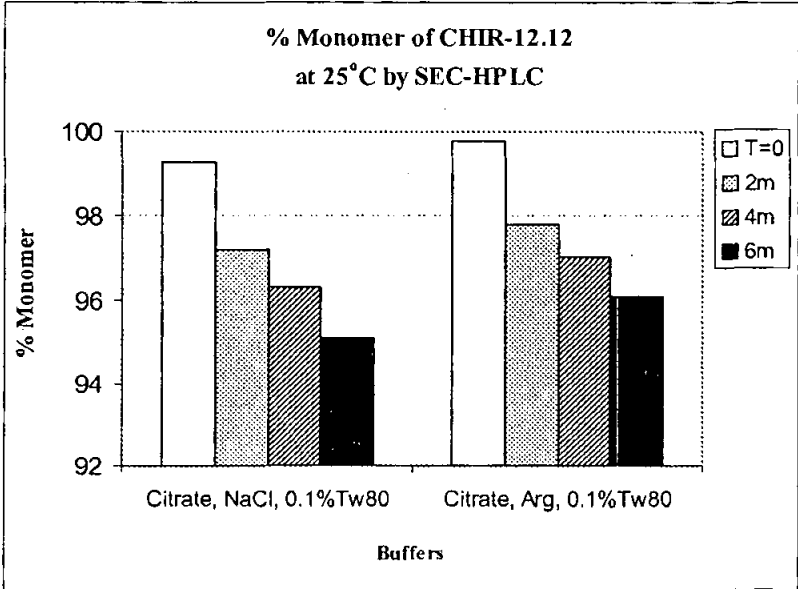


FIGURE 8

00123

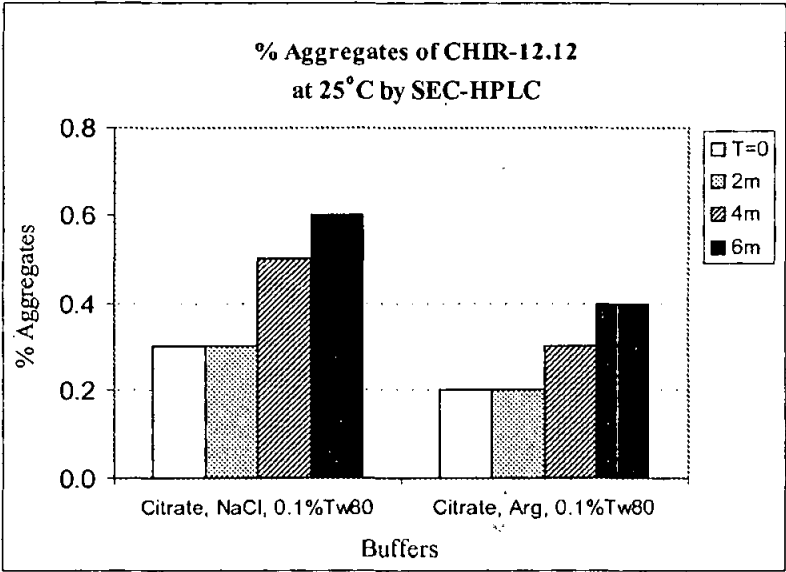


FIGURE 9

00105

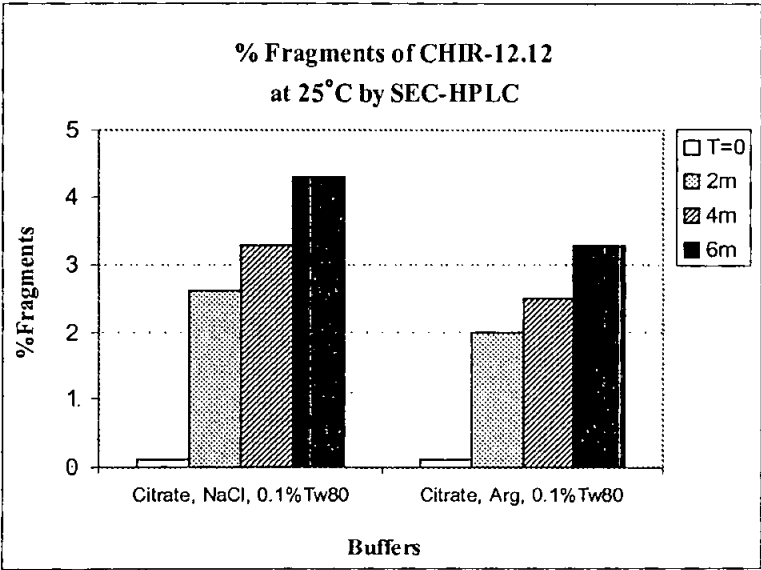


FIGURE 10

00165

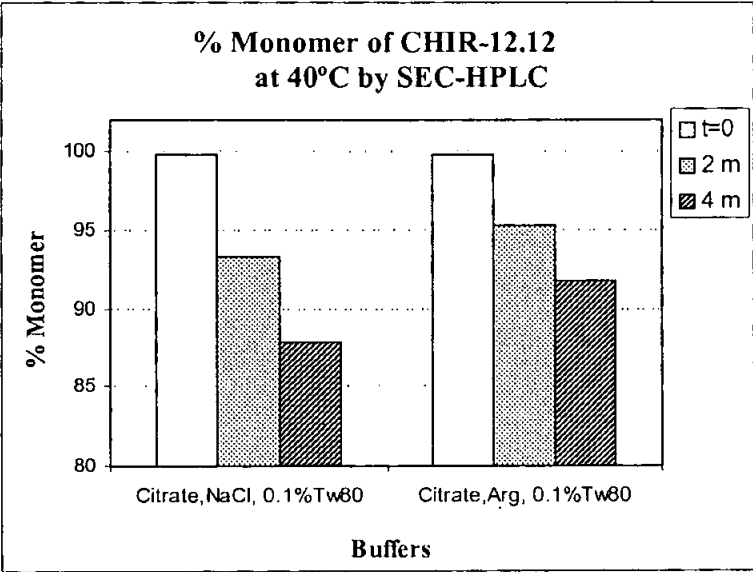


FIGURE 11

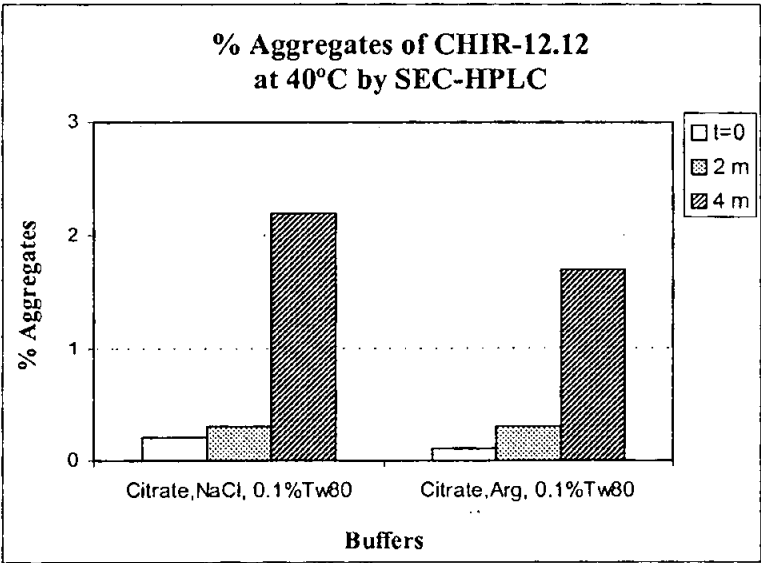


FIGURE 12

001001

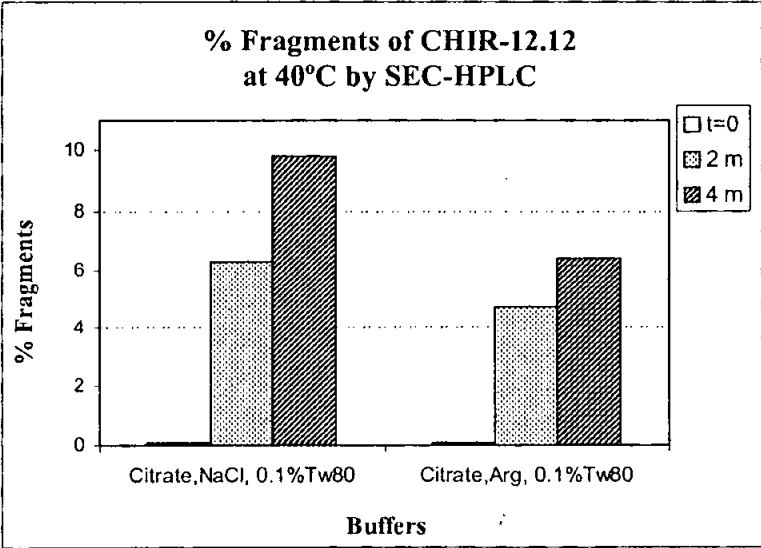


FIGURE 13

00138

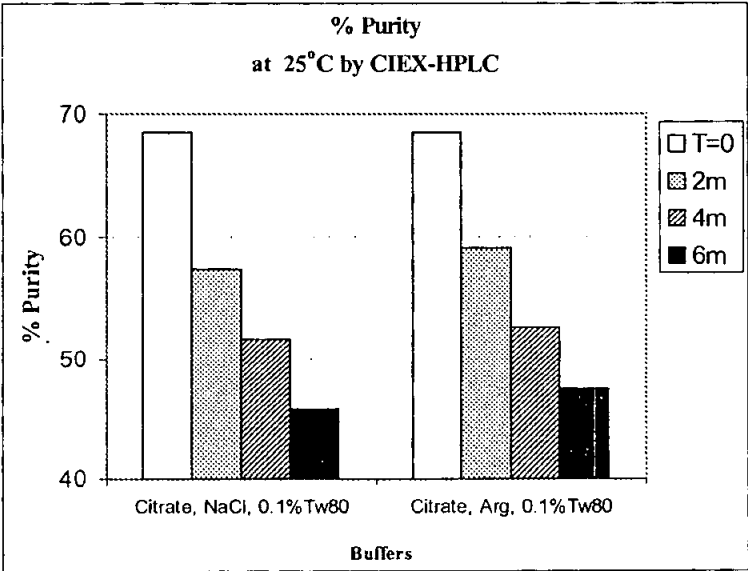


FIGURE 14

00129

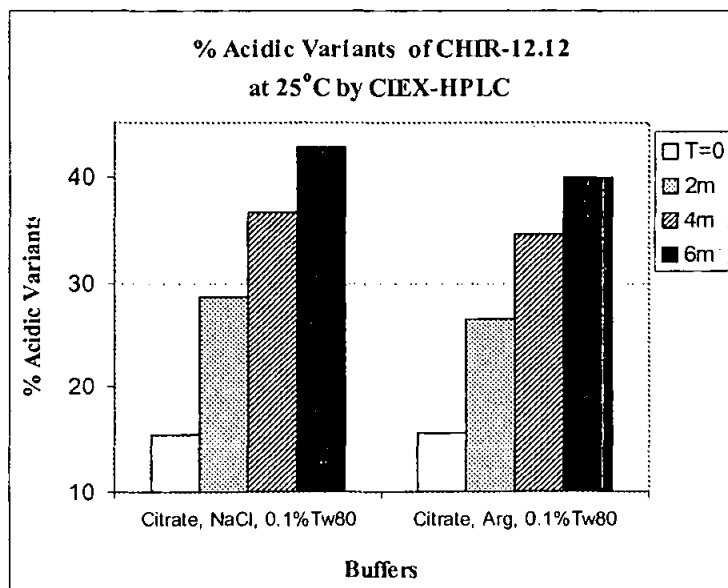


FIGURE 15

00170

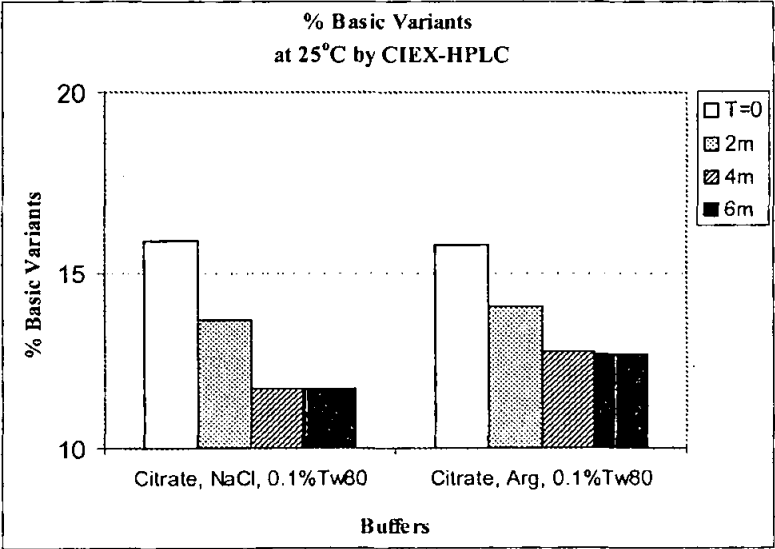


FIGURE 16

SEQUENCE LISTING

<110> Lu, Xiaofeng
Chen, Bao-Lu
Araya, Kidisti
Okhamafe, Augustus

<120> Antagonist Anti-CD40 Antibody Pharmaceutical Compositions

<130> PP028228.0002 (325023)

<150> 60/794,011

<151> 2006-04-21

<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	

00172

```

                                SEQLISTPP028228 0002(325023).TXT
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

00170

SEQLISTPP028228 0002(325023).TXT

<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	gtc	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	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc		1872
gac	ggc	tcc	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				

00175

SEQLISTPP028228 0002(325023).TXT
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

00175

SEQLISTPP028228 0002(325023).TXT
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 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

00170

SEQLISTPP028228 0002(325023).TXT

<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

SEQLISTPP028228:0002(325023).TXT
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

00178

SEQLISTPP028228 0002(325023).TXT
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 65 70

SEQLISTPP028228 0002(325023).TXT

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

```
<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	

SEQLISTPP028228 0002(325023).TXT

Leu Tyr Gln Lys Gly Gly Gln Glu Ala Asn Gln
180 185 190
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

SEQLISTPP028228 0002(325023).TXT
 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

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

ALSTON & BIRD LLP

JUL 27 2007

RECEIVED BY

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

HERNRY, Leslie, T.
ALSTON & BIRD LLP
Bank Of America Plaza
101 South Tryon Street, Suite 4000
Charlotte, NC 28280-4000
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 16 July 2007 (16.07.2007)	
Applicant's or agent's file reference PP028228.0002(325023)	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2007/066757	International filing date (day/month/year) 17 April 2007 (17.04.2007)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 21 April 2006 (21.04.2006)
Applicant NOVARTIS AG et al	

- By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
21 April 2006 (21.04.2006)	60/794,011	US	10 July 2007 (10.07.2007)

ALSTON & BIRD
JUL 27 2007
RECEIVED

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Dorothee Mülhausen
Facsimile No. +41 22 338 82 70	e-mail Telephone No. +41 22 338 74 01

PATENT COOPERATION TREATY

ALSTON & BIRD LLP

NOV 02 2007

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT RECEIVED BY: R

To:

ALSTON & BIRD, LLP
Attn: Henry, Leslie T.
Bank of America Plaza
101 South Tryon Street, Suite 4000
Charlotte, NC 28280-4000
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

ALSTON & BIRD

JS ATA 11/5/07
RECEIVED

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing
(day/month/year)

30/10/2007

Applicant's or agent's file reference

PP028228.0002 (325023)

FOR FURTHER ACTION

See paragraphs 1 and 4 below

International application No.

PCT/US2007/066757

International filing date

(day/month/year)

17/04/2007

Applicant

NOVARTIS AG

1. ☒ 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 two months from the date of transmittal of the International Search Report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70

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 90b/s.1 and 90b/s.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.

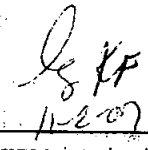
See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

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

Authorized officer

Michela Digiusto


11-2-07

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 and the written opinion of the International Searching Authority, 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 (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

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 (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.

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference PP028228.0002 (325023)	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2007/066757	International filing date (day/month/year) 17/04/2007	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 21/04/2006
Applicant NOVARTIS AG		

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 7 sheets.

☒ 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
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ 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**,

- ☒ 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. 8
☒ 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. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. 000000

PCT/US2007/066757

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
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☒ contained in the international application as filed
 - ☒ filed together with the international application in electronic form
 - ☐ 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/US2007/066757

no 107

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. 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)
C07K

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99/37329 A (ASTRA AB [SE]; FLINK OLA [SE]; PETREN SVEN [SE]) 29 July 1999 (1999-07-29) abstract page 3, lines 4-11 page 5, lines 1-3 page 6, lines 10,11 page 9, lines 7-10	1-62
X	US 2005/175611 A1 (MAHLER HANNS-CHRISTIAN [DE] ET AL) 11 August 2005 (2005-08-11) paragraphs [0022] - [0034] ----- -/--	1-62

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family 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.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 October 2007

Date of mailing of the international search report

30/10/2007

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Irion, Andrea

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national application No
PCT/US2007/066757

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2006/020935 A (WYETH CORP [US]; LI LI [US]; KANTOR ANGELA [US]; MACMILLAN SHANNON B []) 23 February 2006 (2006-02-23) paragraph [0010] paragraph [0076] paragraph [0080] paragraph [0103] paragraphs [0127] - [0129] paragraphs [0143] - [0146] paragraph [0157] paragraphs [0183] - [0187]	1-62
Y	ZHENG ET AL: "Influence of pH, buffer species, and storage temperature on physicochemical stability of a humanized monoclonal antibody LA298" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, AMSTERDAM, NL, vol. 308, no. 1-2, 3 February 2006 (2006-02-03), pages 46-51, XP005249234 ISSN: 0378-5173 abstract	1-62
A	TSUMOTO KOUHEI ET AL: "Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification" BIOTECHNOLOGY PROGRESS, XX, XX, vol. 20, no. 5, September 2004 (2004-09), pages 1301-1308, XP002383385 ISSN: 8756-7938 the whole document	1-62
A	ISHIBASHI M ET AL: "Is arginine a protein-denaturant?" PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 42, no. 1, July 2005 (2005-07), pages 1-6, XP004918440 ISSN: 1046-5928 the whole document	1-62
A	MAHLER H-C ET AL: "Induction and analysis of aggregates in a liquid IgG1-antibody formulation" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 59, no. 3, April 2005 (2005-04), pages 407-417, XP004780138 ISSN: 0939-6411 the whole document	1-62

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national application No

PCT/US2007/066757

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	MATHEUS SUSANNE ET AL: "A critical evaluation of T-m(FTIR) measurements of high-concentration IgG(1) antibody formulations as a formulation development tool" PHARMACEUTICAL RESEARCH (DORDRECHT), vol. 23, no. 7, July 2006 (2006-07), pages 1617-1627, XP002454792 ISSN: 0724-8741 the whole document	1-62
P,X	WO 2006/125207 A (AMGEN INC [US]; CHU GRACE C [US]) 23 November 2006 (2006-11-23) the whole document	1-62
E	WO 2007/092772 A (MEDIMMUNE INC [US]; ALLAN CHRISTIAN [US]; LEACH WILLIAM [US]; CHANG ST) 16 August 2007 (2007-08-16) the whole document	1-62
A	WANG WEI: "Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, AMSTERDAM, NL, vol. 185, no. 2, 20 August 1999 (1999-08-20), pages 129-188, XP002323952 ISSN: 0378-5173 the whole document	1-62
Y	WO 2005/044854 A (CHIRON CORP [US]; LONG LI [US]; LUQMAN MOHAMMAD [US]; YABANNAVAR ASHA) 19 May 2005 (2005-05-19) the whole document	1-62

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/066757

nn, 98

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. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 35-44,59,60 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

national application No

PCT/US2007/066757

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9937329	A	29-07-1999	AU 2444899 A	09-08-1999
US 2005175611	A1	11-08-2005	NONE	
WO 2006020935	A	23-02-2006	AU 2005272603 A1 CA 2575870 A1 EP 1784219 A2 US 2006115472 A1	23-02-2006 23-02-2006 16-05-2007 01-06-2006
WO 2006125207	A	23-11-2006	US 2006269543 A1	30-11-2006
WO 2007092772	A	16-08-2007	NONE	
WO 2005044854	A	19-05-2005	AU 2004287482 A1 AU 2004287879 A1 CA 2544853 A1 CA 2544948 A1 CA 2544949 A1 EP 1694360 A2 EP 1682178 A2 EP 1682180 A2 JP 2007510666 T JP 2007512243 T KR 20060111555 A KR 20060132602 A WO 2005044306 A2 WO 2005044294 A2	19-05-2005 19-05-2005 19-05-2005 19-05-2005 19-05-2005 30-08-2006 26-07-2006 26-07-2006 26-04-2007 17-05-2007 27-10-2006 21-12-2006 19-05-2005 19-05-2005

PATENT COOPERATION TREATY

00102

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

To:

see form PCT/ISA/220

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.
PCT/US2007/066757

International filing date (day/month/year)
17.04.2007

Priority date (day/month/year)
21.04.2006

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/28

Applicant
NOVARTIS AG

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 43bis.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") except that 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 66.1bis(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 3 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.

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:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Irion, Andrea

Telephone No. +49 89 2399-8174



00103

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2007/066757

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
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) 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:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☒ filed together with the international application in electronic 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:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2007/066757

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. 35-44, 59, 60 (IA)

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 35-44, 59, 60 (IA) relate to the following subject matter which does not require an international search (*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 (*specify*):

☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13*ter*.1(a) or (b).

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.

☐ See Supplemental Box for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2007/066757

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-62</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-62</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-34, 45-58, 61, 62</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9)

see form 210

Item III

III.1 With respect to claims 35-44, 59 and 60

Claims 35-44, 59 and 60 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(I) PCT).

Item V

V.1 Reference is made to following documents

- D1: WO9937329 (ASTRA AKTIEBOLAG) 29 July 1999 (1999-07-29)
- D2: US2005/0175611 (MAHLER ET AL.) 11 August 2005 (2005-08-11)
- D3: WO2006020935 (WYETH) 23 February 2006 (2006-02-23)
- D4: J.Y. ZHENG & L.J. JANIS: 'Influence of pH, buffer species, and storage temperature on physicochemical stability of a humanized monoclonal antibody LA298', INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, 03 February 2006 (2006-02-03), vol. 308, no. 1-2, pages 46-51
- D5: K. TSUMOTO ET AL.: 'Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification', BIOTECHNOLOGY PROGRESS, September 2004 (2004-09), vol. 20, no. 5, pages 1301-1308
- D6: ISHIBASHI ET AL.: 'Is arginine a protein-denaturant?', PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, July 2005 (2005-07), vol. 42, no. 1, pages 1-6
- D7: H.-C. MAHLER ET AL.: 'Induction and analysis of aggregates in a liquid IgG1-antibody formulation', EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, April 2005 (2005-04), vol. 59, no. 3, pages 407-417
- D8: S. MATHEUS ET AL.: 'A critical evaluation of T-m(FTIR) measurements of high-concentration IgG(1) antibody formulations as a formulation development tool', PHARMACEUTICAL RESEARCH, July 2006 (2006-07), vol. 23, no. 7, pages 1617-1627
- D9: WO2006125207 (AMGEN INC.) 23 November 2006 (2006-11-23)
- D10: WO2007092772 (MEDIMMUNE, INC.) 16 August 2007 (2007-08-16)
- D11: WO2005044854 (CHIRON) 19 May 2005 (2005-05-19)

V.2 Novelty (Article 33(2) PCT)

V.2.1 With respect to claims 1-62

None of the documents cited above describe a liquid composition comprising an antagonist anti-CD40 antibody, Arg-HCl, citrate/citric acid buffer, pH 5.0-7.0. Therefore, the subject-matter of claims 1-62 is considered novel in the sense of Article 33(2) PCT.

V.3 Inventive step (Article 33(3) PCT)

V.3.1 With respect to claims 1-62

Document D1 describes a pharmaceutical formulation comprising an humanized IgG1 antibody (0.5 mg/ml to 10 mg/ml), a citrate buffer (5 mM to 20 mM) and the pH of the formulation is 5.3 to 7.2 (abstract). Preferably, the pH is 5.5, citrate buffer is present at 10 mM (p. 3 l. 4-11, p. 5 l. 1-3). NaCl is added to make the solution isotonic (p. 6 l. 10-11). The formulations were stable at 5°C for 24 months (p. 9 l. 7-10).

Document D2 describes a pharmaceutical preparation comprising an anti-EGFR antibody (0.1-50 mg/ml) (paragraph [22]), citrate buffer (10 mM) (paragraph [23]), pH 5.5 (paragraph [24]), arginine-HCl (100 mM) (paragraph [26]-[27]), Tween (0.001-1.0%) (paragraph [28]-[30]). Said preparation is stable over a period of up to 2 years at elevated temperatures, i.e. 25°C (paragraph [25]). The osmolality is from 250-350 mOsmol/kg (paragraph [31]). NaCl is used as isotonicity modifier (paragraph [32]). Antioxidants are added (paragraph [33]). A particularly advantageous embodiment is the aqueous preparation comprising 5 mg/ml antibody, 10 mM of citrate buffer having a pH of 5.5, 100 mM of arginine, 100 mM NaCl and 0.01% of polyoxyethylene (2) sorbitan monooleate (paragraph [34]).

Document D3 describes a stable antibody formulation comprising 10 mM citrate buffer, pH 5.5 and 75 mM NaCl (paragraph [10]). The formulation is stable for at least 3 years at 5°C (paragraph [8]). See also paragraph [76], [80], [103], [127]-[129], [143]-[146], [157], [183]-[187].

Document D4 describes a formulation comprising an IgG1 antibody, citrate buffer at pH 5.0-5.5 (abstract).

Documents D5 and D6 describe the effects of arginine on protein aggregation during storage and at high temperatures (e.g. D5: p. 1304 left-hand col. 2nd paragraph -

right-hand col. 2nd paragraph).

Document D7 describes the protecting effect of polysorbate 80 on protein aggregation in a IgG1 antibody formulation (abstract).

Document D11 describes the anti-CD40 antibodies CHIR-12.12 and CHIR-5.9 used in the present application (see whole document).

Pharmaceutical compositions comprising an antibody, a citrate buffer at pH 5.5 and arginine-HCl are known in the field (see e.g. D2). Furthermore, various antibodies are stored in citrate buffer at pH 5.5 further comprising an isotonicity modifier (see e.g. D1-D3).

Considering document D2 as the closest prior art document, the subject-matter of claims 1-62 differs from D2 in that the antibody is directed against CD40 and has an antagonistic activity. The technical problem to be solved may be regarded as providing an antibody formulation comprising an alternative antibody. Said technical problem is solved only for the antibody formulations shown in the present application.

It appears that the conditions, i.e. buffer, pH, excipients, are largely dependent on the sequence or structure of the antibody used. The present application shows an optimal formulation comprising the antibody CHIR-12.12 (Examples 1-3) and the effects of various buffer species, methionine, Arginine-HCl, and Tween on the stabilization of said antibody. Antibodies directed against a specific antigen, i.e. CD40, or an epitope, can comprise differing sequences and structures. Said antibodies comprise similar antigen binding structures. However, the variable domains defining said binding structure are only a small part of the whole antibody molecule. Therefore, it appears that the formulations defined in present claims 1-62 cannot be generalized for any anti-CD40 antibodies or fragments derived from the CHAIR-12.12 antibody. Thus, the subject-matter of claims 1-62 is not considered inventive in the sense of Article 33(3) PCT.

V.4 Industrial applicability (Article 33(4) PCT)

V.4.1 With respect to claims 1-34, 45-58, 61 and 62

The subject-matter of claims 1-34, 45-58, 61 and 62 appears to be susceptible of industrial application.

V.4.2 With respect to claims 35-44, 59 and 60

The subject-matter of claims 35-44, 59 and 60 is considered to be a method of treatment by therapy of the human or animal body.

For the assessment of the present claims 35-44, 59 and 60 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.

V.5 Further remarks

V.5.1 With respect to claims 1, 45, and 46

The expression "near isotonic" used in claims 1, 45, and 46 is vague and unclear (Article 6 PCT).

V.5.2 With respect to claims 1-4, 8-11, 16, 17, 19, 20, 24-29, 31-33, 45-49, 53, 56-58, and 61

The repeated use of the non-restrictive phrase "about [...]" introduces ambiguity into claims 1-62.

V.5.3

In a later European regional phase objections might be raised against any expression within the description such as "incorporation by reference" (e.g. p. 9 l. 27-28, p. 10 l. 8 and 14, p. 18 l. 16, p. 27 l. 21 and 31-32, p. 31 l. 23-24, p. 32 l. 3-4, p. 42 l. 33, p. 44 l. 32, p. 45 l. 9-10, p. 45 l. 28, p. 47 l. 6-7, p. 49 l. 31 etc.) as the regional patent law requires that the specification is self-contained.

V.5.4 With respect to D8

The examination report has been based on an assumed valid priority for the present application. Should the priority of the present application not be valid, the above cited document D8 would be relevant with respect to novelty and inventive step (Article 33(2) and (3) PCT).

Item VI

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2007/066757

VI.1 With respect to documents D9-D10

The examination report has been based on an assumed valid priority for the present application. Should the priority of the present application not be valid, the above cited document D9 would be relevant with respect to novelty and inventive step (Article 33(2) and (3) PCT). Furthermore, should the present application be entered into the regional phase, the documents D9-D10 could be relevant to the question of novelty.

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information	For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.
Amending claims under Art. 19 PCT	Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.
Filing a demand for international preliminary examination	In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/ WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT). If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).
Filing informal comments	After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.
End of the international phase	At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPER (international preliminary examination report).
Relevant PCT Rules and more information	Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003

Bitte beachten Sie, dass angeführte Nichtpatentliteratur (wie z. B. wissenschaftliche oder technische Dokumente) je nach geltendem Recht dem Urheberrechtsschutz und/oder anderen Schutzarten für schriftliche Werke unterliegen könnte. Die Vervielfältigung urheberrechtlich geschützter Texte, ihre Verwendung in anderen elektronischen oder gedruckten Publikationen und ihre Weitergabe an Dritte ist ohne ausdrückliche Zustimmung des Rechtsinhabers nicht gestattet.

Veillez noter que les ouvrages de la littérature non-brevets qui sont cités, par exemple les documents scientifiques ou techniques, etc., peuvent être protégés par des droits d'auteur et/ou toute autre protection des écrits prévue par les législations applicables. Les textes ainsi protégés ne peuvent être reproduits ni utilisés dans d'autres publications électroniques ou imprimées, ni rediffusés sans l'autorisation expresse du titulaire du droit d'auteur.

Please be aware that cited works of non-patent literature such as scientific or technical documents or the like may be subject to copyright protection and/or any other protection of written works as appropriate based on applicable laws. Copyrighted texts may not be copied or used in other electronic or printed publications or re-distributed without the express permission of the copyright holder.

XS CPRTENFRDE

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS DE ANTICUERPO ANTAGONISTA ANTI-CD40 nnn33**CAMPO DE LA INVENCION**

5 La presente invención está dirigida al campo de las
formulaciones farmacéuticas, más particularmente a las
composiciones farmacéuticas líquidas estables que comprenden
anticuerpos antagonistas anti-CD40 para uso en tratamiento de
enfermedades proliferativas y enfermedades que tienen un
10 componente autoinmune o inflamatorio.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Recientes avances en el desarrollo de la tecnología de
15 ingeniería genética han suministrado una variedad de polipéptidos
biológicamente activos en cantidades suficientemente grandes para
uso como fármacos. Los polipéptidos, sin embargo, pueden perder
la actividad biológica como resultado de inestabilidades físicas,
incluyendo la desnaturalización y la formación de agregados
20 solubles e insolubles, y una variedad de inestabilidades
químicas, tales como la hidrólisis, oxidación, y desamidación. La
estabilidad de los polipéptidos en las formulaciones
farmacéuticas líquidas se puede afectar, por ejemplo, mediante
factores tales como el pH, la concentración iónica, la
25 temperatura, los ciclos repetidos de congelamiento-
descongelamiento, y la exposición a fuerzas de corte mecánicas
tal como ocurre durante el procesamiento. La formación de
agregado y la pérdida de actividad biológica también pueden
ocurrir como resultado de la agitación física y las interacciones

de moléculas de polipéptido en solución y en las interfaces
líquido-aire dentro de frascos de almacenamiento. Los cambios
conformacionales adicionales pueden ocurrir en polipéptidos
adsorbidos a las interfaces aire-líquido y sólido-líquido durante
5 la compresión-extensión de las interfaces que resultan de la
agitación durante el transporte u otro. Tal agitación puede
originar que la proteína se enmarañe, agregue, forme partículas,
y finalmente se precipite con otras proteínas adsorbidas. Para
una revisión general de la estabilidad de los farmacéuticos de
10 proteína, ver, por ejemplo, Manning et al. (1989) *Pharm. Res.*
6:903-918, y Wang y Hanson (1988) *J. Parenteral Sci. Tech.*
42:S14.

La inestabilidad de las formulaciones farmacéuticas líquidas
15 que contiene polipéptido ha impulsado el empaque de estas
formulaciones en la forma liofilizada junto con un medio líquido
adecuado para la reconstitución. Aunque la liofilización mejora
la estabilidad de la composición, muchos polipéptidos exhiben
actividad decreciente, durante el almacenamiento en el estado
20 seco (Pikal (1990) *Biopharm.* 27:26-30) o como un resultado de
formación de agregado o la pérdida de actividad catalítica luego
de la reconstitución como una formulación líquida (ver, por
ejemplo, Carpenter et al. (1991) *Develop. Biol. Standard* 74:225-
239; Broadhead et al. (1992) *Drug Devel. Ind. Pharm.* 18:1169-
25 1206; Mumenthaler et al. (1994) *Pharm. Res.* 11:12-20; Carpenter y
Crowe (1988) *Cryobiology* 25:459-470; y Roser (1991) *Biopharm.*
4:47-53). Aunque el uso de aditivos ha mejorado la estabilidad de
las proteínas secas, muchas formulaciones re-hidratadas continúan
teniendo cantidades inaceptables o indeseables de proteína

inactiva, agregada (ver, por ejemplo, Townsend y DeLuca (1983) *J. Pharm. Sci.* 80:63-66; Hora et al. (1992) *Pharm. Res.* 9:33-36; Yoshiaka et al. (1993) *Pharm. Res.* 10:687-691). También, la necesidad de reconstitución es un inconveniente e introduce la
5 posibilidad de dosificación incorrecta.

Incluidos en los polipéptidos farmacéuticamente útiles están los anticuerpos monoclonales recombinantemente producidos. Entre esta clase de agentes terapéuticos, los anticuerpos antagonistas
10 anti-CD40 que apuntan al miembro receptor de la familia TNF CD40 se mantienen como una gran promesa para el tratamiento de malignidades relacionadas con célula B y malignidades no hematológicas, así como también enfermedades que tienen un componente autoinmune y/o inflamatorio. El receptor CD40 es un
15 antígeno de superficie celular de 50-55 kDa presente en la superficie tanto de células B humanas normales como neoplásicas, células dendríticas monocitos, macrófagos, células T CD8⁺, células endoteliales, células monolíticas y epiteliales, algunos carcinomas epiteliales, y muchos tumores sólidos, que incluyen
20 pulmón, mama, ovario, vejiga urinaria, y cánceres de colon. El antígeno CD40 también se expresa sobre células T activadas, plaquetas activadas, células de músculo liso vascular inflamado, eosinófilos, membranas sinoviales en artritis reumatoide, fibroblastos dérmicos, y otros tipos de célula no linfoide.
25 Dependiendo del tipo de célula que expresa CD40, el ligamiento puede inducir la adhesión intercelular, la diferenciación, la activación y la proliferación.

Por ejemplo, la unión del CD40 a su ligando análogo, CD40L (también designado CD154), estimula la proliferación y la diferenciación de célula B y en células de plasma, la producción de anticuerpo, el cambio de isotipo, y la generación de memoria de célula B. Durante la diferenciación de la célula B, el CD40 se expresa sobre células pre-B pero se pierden luego de la diferenciación en las células de plasma. La expresión del CD40 sobre los APC juega un papel co-estimulatorio importante en la activación de estas células. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales anti-CD40 agonistas (mAbs) se han mostrado por semejar los efectos de las células ayudantes T en la activación de la célula B. Cuando se presenta sobre células adherentes que expresan FcγRII, estos anticuerpos inducen la proliferación de célula B (Banchereau et al. (1989) *Science* 251:70). Más aún, los mAbs anti-CD40 agonistas pueden reemplazar la señal auxiliar T para la secreción de IgM, IgG, e IgE en la presencia de IL-4 (Gascan et al. (1991) *J. Immunol.* 147:8). Adicionalmente, los mAbs anti-CD40 agonistas pueden evitar la muerte celular programada (apoptosis) de las células B aisladas de los nodos linfáticos.

Estas y otras observaciones sostienen la teoría habitual de que la interacción del CD40 y el CD40L juega un papel pivote en la regulación tanto de las respuestas inmune como humoral mediada por célula. Estudios más recientes han revelado un papel mucho más amplio de la interacción CD40/CD40L en diversos procesos fisiológicos y patológicos.

Así, el acoplamiento del CD40 mediante el CD40L y la posterior activación de la señalización del CD40 son etapas necesarias para las respuestas inmunes normales; sin embargo, la desregulación de la señalización CD40 puede conducir a enfermedad. La senda de señalización CD40 se ha mostrado que se involucra en la enfermedad autoinmune (Ichikawa et al. (2002) *J. Immunol.* 169:2781-2787 y Moore et al. (2002) *J. Autoimmun.* 19:139-145). Adicionalmente, la interacción CD40/CD40L juega un papel importante en los procesos inflamatorios. Por ejemplo, tanto el CD40 como el CD40L se sobre-expresan en lesiones de aterosclerosis humana y experimental. La estimulación del CD40 induce la expresión de enzimas degradantes de matriz y expresión de factor de tejido en tipos de célula asociados a ateroma, tales como las células endoteliales, las células de músculo liso, y los macrófagos. Además, la estimulación del CD40 induce la producción de citoquinas pro-inflamatorias tales como el IL-1, IL-6, e IL-8, y las moléculas de adhesión tales como el ICAM-1, la E-selectina, y VCAM. La inhibición de la interacción CD40/CD40L evita la aterogenia en modelos animales. En modelos de trasplante, bloquear la interacción del CD40/CD40L evita la inflamación. Se ha mostrado que la unión del CD40/CD40L actúa sinérgicamente con el péptido beta amiloide del Alzheimer para promover la activación microglial, conduciendo así a neuro-toxicidad. En pacientes con artritis reumatoide (RA), la expresión del CD40 se incrementa sobre los condrocitos articulares, así, la señalización del CD40 contribuye probablemente a la producción de daño de citoquinas y metaloproteinasas de matriz. Ver, Gotoh et al. (2004) *J. Rheumatol.* 31:1506-1512.

De manera similar, las células B malignas provenientes de los tipos de tumor de linaje de la célula B expresan CD40 y parecen depender de la señalización de CD40 para la supervivencia y proliferación. Las células transformadas de pacientes con
5 linfomas de célula B de bajo y alto grado, la leucemia linfoblástica aguda de célula B, el mieloma múltiple, la leucemia linfocítica crónica, la Macroglobulinemia de Walsdenstrom, y la enfermedad de Hodgkin expresan CD40. La expresión del CD40 también se detecta en dos tercios de los casos de leucemia
10 mieloblástica aguda y el 50% de los linfomas relacionados con SIDA.

Un número de carcinomas y sarcomas también exhibe altos niveles de expresión de CD40, aunque el papel de la señalización
15 del CD40 en relación con la expresión del CD40 sobre estas células cancerosas es menos bien entendido. Los carcinomas que expresan CD40 incluyen el carcinoma de la vejiga urinaria (Paulie et al. (1989) *J. Immunol.* 142:590-595; Braesch-Andersen et al. (1989) *J. Immunol.* 142:562-567), carcinoma de mama (Hirano et al.
20 (1999) *Blood* 93:2999-3007; Wingett et al. (1998) *Breast Cancer Res. Treat.* 50:27-36); cáncer de próstata (Rokhlin et al. (1997) *Cancer Res.* 57:1758-1768), carcinoma de célula renal (Kluth et al. (1997) *Cancer Res.* 57:891-899), carcinoma nasofaríngeo no diferenciado (UNPC) (Agathangelou et al. (1995) *Am. J. Pathol.*
25 147:1152-1160), carcinoma de célula escamosa (SCC) (Amo et al. (2000) *Eur. J. Dermatol.* 10:438-442; Posner et al. (1999) *Clin. Cancer Res.* 5:2261-2270), carcinoma papilar de tiroides (Smith et al. (1999) *Thyroid.* 9:749-755), melanoma maligno cutáneo (van den Oord et al. (1996) *Am. J. Pathol.* 149:1953-1961), carcinoma

gástrico (Yamaguchi *et al.* (2003) *Int. J. Oncol.* 23(6):1697-702),
y carcinoma del hígado (ver, por ejemplo, Sugimoto *et al.* (1999)
Hepatology 30(4):920-26, discuten el carcinoma hepatocelular
humano). Para los sarcomas que expresan CD40, ver, por ejemplo,
5 Lollini *et al.* (1998) *Clin. Cancer Res.* 4(8):1843-849, que
discuten el osteosarcoma humano y el sarcoma de Ewing.

Dados los beneficios terapéuticos potenciales de los
anticuerpos antagonistas anti-CD40 en regular la señalización
10 CD40 mediada por CD40L en varios cánceres y enfermedades
autoinmunes/inflamatorias, y los retos de formular estos
polipéptidos, son necesarias las composiciones farmacéuticas
estables que comprenden estos anticuerpos.

15

BREVE RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Se suministran composiciones farmacéuticas líquidas estables
que comprenden un anticuerpo antagonista anti-CD40 como un
componente terapéutica o profilácticamente activo y métodos
20 útiles en su preparación. Estas composiciones comprenden el
anticuerpo antagonista anti-CD40, un agente amortiguador para
mantener el pH de la composición entre aproximadamente pH 5.0 y
aproximadamente pH 7.0, y una cantidad de arginina-HCl suficiente
para hacer la composición líquida casi isotónica. En algunas
25 modalidades, el agente amortiguante es un amortiguador de
citrato/ácido cítrico, el anticuerpo antagonista anti-CD40 es el
anticuerpo antagonista anti-CD40 CHIR-12.12 o CHIR-5.9 o el
fragmento de unión a antígeno de éste, la composición comprende
arginina-HCl como el agente isotonizante, y la composición

comprende además un tensoactivo no iónico y/o una metionina L como agentes estabilizantes adicionales. Las composiciones farmacéuticas que contienen el anticuerpo antagonista anti-CD40 líquidas estables de la invención encuentran uso en métodos para 5 tratar enfermedades proliferativas y enfermedades que tienen un componente autoinmune y/o inflamatorio.

BREVE DESCRIPCIÓN DE VARIAS VISTAS DE LOS DIBUJOS

10 La Figura 1 muestra el efecto de especies amortiguadoras sobre la pureza de las formulaciones CHIR-12.12 mAb almacenadas a 25°C durante 3 meses o 5 meses medidas mediante análisis SEC-HPLC.

15 La Figura 2 muestra el efecto de especies amortiguadoras sobre la formación de agregado del CHIR-12.12 mAb dentro de varias formulaciones de anticuerpo almacenadas a 25°C durante 3 meses o 5 meses, medidas mediante análisis SEC-HPLC.

20 La Figura 3 muestra el efecto de especies amortiguadoras sobre la fragmentación del CHIR-12.12 mAb dentro de varias formulaciones de anticuerpo almacenadas a 25°C durante 3 meses o 5 meses, medidas mediante análisis SEC-HPLC.

25 La Figura 4 muestra el efecto de especies amortiguadoras sobre la pureza de las formulaciones CHIR-12.12 mAb almacenadas a 40°C durante 3 meses o 5 meses medidas mediante análisis SEC-HPLC.

La Figura 5 muestra el efecto de especies amortiguadoras sobre la formación de agregado del CHIR-12.12 mAb dentro de varias formulaciones de anticuerpo almacenadas a 40°C durante 3 meses o 5 meses, medidas mediante análisis SEC-HPLC.

La Figura 6 muestra el efecto de especies amortiguadoras sobre la fragmentación del CHIR-12.12 mAb dentro de varias formulaciones de anticuerpo almacenadas a 40°C durante 3 meses o 5 meses, medidas mediante análisis SEC-HPLC.

La Figura 7 muestra los termogramas de calorimetría de exploración diferencial para el CHIR-12.12 mAb en las formulaciones que contienen NaCl o L-arginina-HCl como el agente isotonzante.

La Figura 8 muestra el % de la forma de monómero del CHIR-12.12 mAb restante en las formulaciones que contienen NaCl o L-arginina-HCl como el agente isotonzante cuando se almacena a 25°C durante 2, 4, o 6 meses, medido mediante SEC-HPLC.

La Figura 9 muestra el % de agregados de CHIR-12.12 mAb en formulaciones que contienen NaCl o L-arginina-HCl como el agente isotonzante cuando se almacena a 25°C durante 2, 4, o 6 meses, medido mediante SEC-HPLC.

La Figura 10 muestra el % de fragmentos de CHIR-12.12 mAb en formulaciones que contienen NaCl o L-arginina-HCl como el agente

isotonizante cuando se almacena a 25°C durante 2, 4, o 6 meses, medido mediante SEC-HPLC.

La Figura 11 muestra el % de la forma de monómero del CHIR-12.12 mAb restante en formulaciones que contienen NaCl o L-arginina-HCl como el agente isotonizante cuando se almacena a 40°C durante 2 o 4 meses, medido mediante SEC-HPLC.

La Figura 12 muestra el % de agregados para CHIR-12.12 mAb en las formulaciones que contienen NaCl o L-arginina-HCl como el agente isotonizante cuando se almacena a 40°C durante 2 o 4 meses, medido mediante SEC-HPLC.

La Figura 13 muestra el % de fragmentos de CHIR-12.12 mAb en formulaciones que contienen NaCl o L-arginina-HCl como el agente isotonizante cuando se almacena a 40°C durante 2 o 4 meses, medido mediante SEC-HPLC.

La Figura 14 muestra el % de pureza de CHIR-12.12 mAb en formulaciones que contienen NaCl o L-arginina-HCl como el agente isotonizante cuando se almacena a 25°C durante 2, 4, o 6 meses, medido mediante CIEX-HPLC.

La Figura 15 muestra el % de variantes ácidas del CHIR-12.12 mAb en formulaciones que contienen NaCl o L-arginina-HCl como el agente isotonizante cuando se almacena a 25°C durante 2, 4, o 6 meses, medido mediante CIEX-HPLC.

La Figura 16 muestra el % variantes básicas del CHIR-12.12 mAb en formulaciones que contienen NaCl o L- arginina-HCl como el agente isotonzante cuando se almacena a 25°C durante 2, 4, o 6 meses, medido mediante CIEX-HPLC.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las presentes invenciones se describirán ahora más completamente en lo sucesivo con referencia a los dibujos que las acompañan, en los cuales algunos, pero no todas las modalidades de las invenciones se muestran. De hecho, estas invenciones pueden ser modalidades en muchas formas diferentes y no se deben considerar como limitadas a las modalidades establecidas aquí; por el contrario, estas modalidades se suministran con el fin de que esta descripción satisfaga los requisitos legales aplicables.

Muchas modificaciones y otras modalidades de las invenciones establecidas aquí vendrán a la mente de un experto en la técnica al cual pertenecen estas invenciones que tenga el beneficio de las enseñanzas presentadas en las descripciones anteriores y los dibujos asociados. Por lo tanto, se debe entender que las invenciones no deben estar limitadas a las modalidades específicas descritas y que las modificaciones y otras modalidades pretenden estar incluidas dentro del alcance de las reivindicaciones finales. Aunque se emplean términos específicos aquí, ellos se utilizan en un sentido genérico y descriptivo solamente y no con propósitos de limitación.

La presente invención se dirige a composiciones farmacéuticas líquidas estables que comprenden por lo menos un anticuerpo antagonista anti-CD40 o un fragmento de unión a antígeno de éste como un componente terapéutica o 5 profilácticamente activo, y a los métodos útiles para su preparación. Para los propósitos de la presente invención, el término "líquido" con relación a las composiciones o formulaciones farmacéuticas pretende incluir el término "acuoso". Por "componente terapéutica o profilácticamente activo" se 10 entiende el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión a antígeno de éste que se incorpora específicamente en la composición para efectuar la respuesta terapéutica o profiláctica deseada con relación al tratamiento, prevención, o diagnóstico de una enfermedad o condición en un sujeto cuando la composición 15 farmacéutica se administra a ese sujeto.

Por "estables" se entiende que las composiciones farmacéuticas de la invención suministren estabilidad física y/o química del anticuerpo antagonista anti-CD40 o del fragmento de 20 unión a antígeno de éste. Esto es, el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión a antígeno de éste esencialmente retiene su estabilidad física y/o química y tiene la actividad biológica deseada, es decir, una o más de las actividades antagonistas definidas en cualquier otra parte aquí, 25 incluyendo, pero no se limita a: la inhibición de la secreción de inmunoglobulina mediante las células B periféricas humanas normales estimuladas por las células T; la inhibición de la supervivencia y/o proliferación de las células B periféricas humanas normales estimuladas por las células T Jurkat; la

inhibición de la supervivencia y/o proliferación de las células B periféricas humanas normales estimuladas por las células que expresan CD40L o el ligando CD40 soluble (sCD40L); la inhibición de las señales intracelulares anti-apoptósicas de "supervivencia" en cualquier célula estimulada por el sCD40L o el CD40L de fase sólida; la inhibición de la transducción de la señal CD40 en cualquier célula luego del ligamiento con el sCD40L o el CD40L de fase sólida; la inhibición de proliferación de las células B malignas humanas; supresión, inducción a la anergia y/o tolerancia a las células objetivo que llevan el CD40 o a los ligandos análogos que llevan células al CD40 que incluyen, pero no se limitan a, las células T y las células B; la inducción de la expansión o activación de las células T regulatorias CD4⁺CD25⁺ (ver por ejemplo, rechazo de tejido específico de aloantígeno donador pro vía de la interferencia de CD40-CD40L, van Maurik et al. (2002) *J. Immunol.* 169:5401-5404); citotoxicidad por vía de cualquier mecanismo (incluyendo, pero no se limita a, citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC), citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), sub-regulación de proliferación, y/o apoptósisis en las células objetivo); modulación de la secreción de la citoquina de la célula objetivo y/o la expresión de la molécula de la superficie de la célula; y combinaciones de ésta.

Los métodos para monitorear la estabilidad de la proteína se conocen bien en la técnica. Ver, por ejemplo, Jones (1993) *Adv. Drug Delivery Rev.* 10:29-90; Lee, ed. (1991) *Peptide and Protein Drug Delivery* (Marcel Dekker, Inc., New York, New York); y los ensayos de estabilidad descritos aquí adelante. En general, la

estabilidad de la proteína se mide a una temperatura escogida durante un período de tiempo específico. En las modalidades preferidas, una composición farmacéutica de anticuerpo estable suministra la estabilidad del anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión a antígeno de éste cuando se almacena a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) durante por lo menos 1 mes, por lo menos 3 meses, o por lo menos 6 meses, y/o es estable a aproximadamente 2-8°C durante por lo menos 6 meses, por lo menos 9 meses, por lo menos 12 meses, por lo menos 18 meses, por lo menos 24 meses.

Una proteína tal como un anticuerpo, cuando se formula en una composición farmacéutica, se considera que retiene su estabilidad física en un punto dado de tiempo si éste no muestra signos visuales (es decir, la decoloración o la pérdida de claridad) o los signos medibles (por ejemplo, utilizar cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) o dispersión de luz UV) de precipitación, agregación, y/o desnaturalización en esa composición farmacéutica. Con respecto a la estabilidad química, una proteína tal como un anticuerpo, cuando se formula en una composición farmacéutica, se considera que retiene su estabilidad química en un punto de tiempo dado si las mediciones de la estabilidad química son indicativas de que esa proteína (es decir, anticuerpo) retiene la actividad biológica de interés en esa composición farmacéutica. Los métodos para monitorear los cambios en la estabilidad química se conocen bien en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, métodos para detectar formas químicamente alteradas de la proteína tal como el resultado de

recorte, utilizando, por ejemplo, SDS-PAGE, SEC, y/o ionización desorción láser ayudada por matriz/tiempo de espectrometría de masa de vuelo; y degradación asociada con los cambios en la carga molecular (por ejemplo, asociada con la desamidación) utilizando, por ejemplo, cromatografía de intercambio de ión. Ver, por ejemplo, los métodos descritos aquí adelante.

El anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión a antígeno de éste, cuando se formula en una composición farmacéutica, se considera que retiene una actividad biológica deseada en un punto de tiempo dado si la actividad biológica deseada en ese momento está en aproximadamente 30%, preferiblemente en aproximadamente 20% de la actividad biológica deseada exhibida en el momento en que 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 antagonistas anti-CD40 descritos aquí, y los fragmentos de unión a antígeno de éstos, se pueden desarrollar como se describió en las solicitudes provisionales tituladas "*Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use*," presentadas en noviembre 4, 2003, noviembre 26, 2003, y abril 27, 2004, y las Solicitudes de Patente U.S. cedidas Nos. 60/517,337 (Referencia de Abogado No. PP20107.001 (035784/258442)), 60/525,579 (Referencia de Abogado PP20107.002 (035784/271525)), y 60/565,710 (Referencia de Abogado No. PP20107.003 (035784/277214)), respectivamente; y la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US2004/037152 (Referencia de Abogado No. PP20107.004 (035784/282916)), también titulada "*Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods*

for Their Use," presentada en noviembre 4, 2004, y publicada como WO 2005/044854; cuyos contenidos de cada uno se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Ver también los ensayos descritos en la solicitud provisional titulada "*Methods for*
5 *Diagnosis and Treatment of Proliferative Disorders Mediated by CD40 Signaling,*" presentada en Diciembre 9, 2005, y la Solicitud de Patente de los Estados Unidos cedida No. 60/749,285 (Referencia de Abogado No. PP028035.0002 (035784/304312)), y la correspondiente Solicitud de Patente Internacional No.
10 PCT/US2006/019414 (Referencia de Abogado No. PP028035.0003 (035784/311611)), presentada en mayo 18, 2006, y publicada como WO 2006/125143; y la solicitud provisional titulada "*Methods for Diagnosis and Treatment of Diseases Having an Autoimmune and/or Inflammatory Component,*" presentada en Diciembre 9, 2005, y la
15 Solicitud de Patente U.S. cedida No. 60/749,336 (Referencia de Abogado No. PP028062.0002 (035784/304311)), y la correspondiente Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US2006/019325 (Referencia de Abogado No. PP028062.0003 (035784/311608)), presentada en mayo 18, 2006, y publicada como WO 2006/125117;
20 cuyos contenidos de cada una se incorporan aquí como referencia en su totalidad. También ver los ensayos descritos en Schultze et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8200-8204; Denton et al. (1998) *Pediatr. Transplant.* 2:6-15; Evans et al. (2000) *J. Immunol.* 164:688-697; Noelle (1998) *Agents Actions Suppl.* 49:17-
25 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 U.S. Nos. 5,674,492 y 5,847,082; incorporadas aquí como referencia.

El anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión a antígeno de éste que se formula de acuerdo con los métodos de la presente invención se pueden preparar utilizando cualquier método conocido en la técnica, que incluye aquellos métodos descritos en cualquier otra parte aquí. 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 a antígeno de éste se produce recombinantemente en una línea celular CHO como se describe aquí adelante.

10

Luego de su preparación y purificación, el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión a antígeno de éste se puede formular como una composición farmacéutica líquida de la manera como se establece aquí. Donde el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión a antígeno de éste se va a almacenar antes de su formulación, éste se puede congelar, por ejemplo, a $\leq -20^{\circ}\text{C}$, y luego se descongela a temperatura ambiente para formulación adicional.

20

Las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención comprenden una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva del anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión a antígeno de éste. La cantidad de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste presente en la formulación toma en consideración la ruta de administración y el volumen de dosis deseado.

25

De esta manera, las composiciones farmacéuticas líquidas de la presente invención comprenden un anticuerpo antagonista anti-

CD40, por ejemplo, el anticuerpo CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o el fragmento de unión a antígeno de éstos en una concentración de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 50.0 mg/ml, aproximadamente 0.5 mg/ml a aproximadamente 40.0 mg/ml, 5 aproximadamente 1.0 mg/ml a aproximadamente 35.0 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, aproximadamente 10.0 mg/ml a aproximadamente 35.0 mg/ml, o 10 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 el fragmento de unión a antígeno de éste a una concentración de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 5.0mg/ml, aproximadamente 5.0 mg/ml a 15 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 20 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, o aproximadamente 45.0 mg/ml a aproximadamente 50.0 mg/ml. En otras modalidades, la composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo antagonista anti- 25 CD40 o el fragmento de unión a antígeno de éste a una concentración de aproximadamente 15.0 mg/ml, aproximadamente 16.0 mg/ml, aproximadamente 17.0 mg/ml, aproximadamente 18.0 mg/ml, aproximadamente 19.0 mg/ml, aproximadamente 20.0 mg/ml, aproximadamente 21.0 mg/ml, aproximadamente 22.0 mg/ml,

aproximadamente 23.0 mg/ml, aproximadamente 24.0 mg/ml,
aproximadamente 25.0 mg/ml, aproximadamente 26.0 mg/ml,
aproximadamente 27.0 mg/ml, aproximadamente 28.0 mg/ml,
aproximadamente 29.0 mg/ml, aproximadamente 30.0 mg/ml,
5 aproximadamente 31.0 mg/ml, aproximadamente 32.0 mg/ml,
aproximadamente 33.0 mg/ml, aproximadamente 34.0 mg/ml, o
aproximadamente 35.0 mg/ml.

De acuerdo con la presente invención, el anticuerpo
10 antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal
CHIR-12.12 o CHIR-5.9 descrito aquí adelante, o el fragmento de
unión a antígeno de éste, se formula con un amortiguador que
mantiene el pH de la composición farmacéutica en el rango de
aproximadamente un pH 5.0 a aproximadamente un pH 7.0, y una
15 cantidad de arginina en su forma ácida, denominada aquí como
arginina-HCl, suficiente para hacer la composición
aproximadamente isotónica. Por "aproximadamente isotónica" se
entiende que la formulación acuosa tenga una osmolalidad de
aproximadamente 240 mmol/kg a aproximadamente 360 mmol/kg,
20 preferiblemente aproximadamente 240 a aproximadamente 340
mmol/kg, más preferiblemente aproximadamente 250 a
aproximadamente 330 mmol/kg, aún más preferiblemente
aproximadamente 260 a aproximadamente 320 mmol/kg, todavía más
preferiblemente aproximadamente 270 a aproximadamente 310
25 mmol/kg. En algunas modalidades, la composición farmacéutica
líquida tiene una osmolalidad de aproximadamente 295 mmol/kg. Los
métodos para determinar la isotonicidad de una solución se
conocen por aquellos expertos en la técnica. Ver, por ejemplo,
Setnikar et al. (1959) *J. Am. Pharm. Assoc.* 48:628.

La arginina-HCl no solamente sirve como un agente isotonzante, sino también sirve para estabilizar el anticuerpo contra los cambios conformacionales, la formación de agregado, la fragmentación, y/o la desamidación durante el almacenamiento de las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención. Por "durante el almacenamiento" se entiende una composición o formulación farmacéutica líquida que una vez preparada, no se administra inmediatamente a un sujeto. Por el contrario, luego de la preparación, ésta se empaca para almacenamiento, en una forma líquida, en un estado congelado, o en una forma seca para reconstitución posterior en una forma líquida u otra forma adecuada para la administración a un sujeto. Por "forma seca" se entiende que la composición o formulación farmacéutica líquida se seca por secado por congelamiento (es decir, liofilización; ver, por ejemplo, Williams y Polli (1984) *J. Parenteral Sci. Technol.* 38:48-59), secado por rociado (ver Masters (1991) en *Spray-Drying Handbook* (5th ed; Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.), pp. 491-676; Broadhead et al. (1992) *Drug Devel. Ind. Pharm.* 18:1169-1206; y Mumenthaler et al. (1994) *Pharm. Res.* 11:12-20), o secado por aire (Carpenter y Crowe (1988) *Cryobiology* 25:459-470; y Roser (1991) *Biopharm.* 4:47-53). Los cambios conformacionales, la formación de agregado, fragmentación, y/o desamidación de un anticuerpo durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida puede afectar adversamente la actividad biológica del anticuerpo, dando como resultado la pérdida de eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Adicionalmente, la formación de agregado puede originar otros problemas tales como el bloqueo de tubería, membranas, o bombas

cuando la composición farmacéutica que contiene el anticuerpo se administra utilizando un sistema de infusión.

Cualquier estereoisómero (es decir, el isómero L, D, o DL) de arginina, o combinaciones de estos estereoisómeros, puede estar presentes en las composiciones farmacéuticas de la invención mientras esté presente la arginina en su forma ácida, es decir, arginina-HCl. Preferiblemente se utiliza el estereoisómero L. Las composiciones de la invención también se pueden formular con los análogos de este amino ácido. Por "análogo de amino ácido" se entiende un derivado del amino ácido de ocurrencia natural que realiza el efecto deseado de hacer la composición aproximadamente isotónica así como también disminuir la formación de agregado, fragmentación, y/o desamidación del polipéptido durante el almacenamiento de las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención. Los análogos de arginina adecuados incluyen, por ejemplo, aaminoguanidina y N-monietil L-arginina. Como con la arginina, los análogos de amino ácido se incorporan en las composiciones en su forma ácida.

La concentración de arginina-HCl en la composición farmacéutica dependerá de la contribución de otros componentes a la tonicidad. En algunas modalidades, la concentración de arginina-HCl es de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 50 nM 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 100 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, 5 aproximadamente 130 mM a aproximadamente 170 mM, aproximadamente 130 mM 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 arginina-HCl es de 10 aproximadamente 125 mM, aproximadamente 150 mM, o aproximadamente 175 mM.

El pH de una composición farmacéutica líquida que contiene el anticuerpo afecta la estabilidad del anticuerpo contenido en 15 éste, principalmente a través de éste afecta la formación de agregado de polipéptido. Así la cantidad del agente amortiguador presente en las composiciones farmacéuticas de la invención variará dependiendo del pH óptimo para la estabilidad de un anticuerpo antagonista anti-CD40 particular de interés. La 20 determinación de este pH óptimo se puede lograr utilizando los métodos generalmente disponibles en la técnica, incluyendo, por ejemplo, Calorimetría de Exploración Diferencial (DSC), que evalúa la estabilidad conformacional; el SDS-PAGE y la cromatografía de exclusión de tamaño (SEC-HPLC), que evalúa la 25 agregación y la fragmentación; y el análisis de HPLC de Intercambio de Catión (CIEX-HPLC), que evalúa la degradación relacionada con el cambio de carga. El pH preferido para las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención es de aproximadamente pH 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8,

5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, y otros valores dentro del rango de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0. En algunas modalidades, el agente amortiguador mantiene el pH de la composición farmacéutica en el

5 rango de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 6.5, aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 6.0, aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 5.5, aproximadamente pH 5.5 a aproximadamente 7.0, aproximadamente pH 5.5 a aproximadamente pH 6.5, o aproximadamente pH 5.5 a aproximadamente pH 6.0.

10

Cualquier agente amortiguador adecuado que mantiene el pH del la composición farmacéutica líquida de anticuerpo antagonista 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

15 estabilidad fisicoquímica y la actividad biológica deseada del anticuerpo se retenga como se anota aquí adelante. Los agentes amortiguantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, ácidos y sales convencionales de éstos, donde el contra ión puede ser, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o magnesio. Ejemplos de

20 ácidos y sales convencionales de éstos que se pueden utilizar para amortiguar la composición farmacéutica líquida incluyen, pero no se limitan a, ácido cítrico o citrato, ácido succínico o succinato, ácido acético o acetato, ácido tartárico o tartrato, ácido fosfórico o fosfato, ácido glucónico o gluconato, ácido

25 glutámico o glutamato, ácido aspártico o aspartato, ácido maléico o maleato, y ácido málico o amortiguadores de malato. Se reconoce que el agente amortiguador puede ser una mezcla del ácido y la forma de sal del ácido, por ejemplo, una mezcla de ácido cítrico y citrato (denominada aquí como un amortiguador de citrato/ácido

cítrico), una mezcla de ácido succínico y succinato (denominada aquí como un amortiguador de succinato/ácido succínico), una mezcla de ácido acético y acetato (denominada aquí como un amortiguador de acetato/ácido acético), y similares para cada uno de los pares de ácido/sales de ácido anteriores. La concentración del agente amortiguante 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, 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 del agente amortiguante es desde 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, u otros de tales valores en el rango desde aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM.

En algunas modalidades de la invención, la composición farmacéutica líquida comprende la concentración deseada (es decir, aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 50.0 mg/ml como se anotó anteriormente) de un anticuerpo antagonista anti-CD40 descrito en cualquier parte aquí, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o el fragmento de unión a antígeno de éste, una cantidad de arginina-HCl para hacer la composición aproximadamente isotónica, y un agente amortiguador que es un amortiguador de citrato/ácido cítrico, donde la concentración del agente amortiguante es tal que el agente amortiguante mantiene el pH de la composición farmacéutica en el rango de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0,

preferiblemente aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 6.5, incluyendo aproximadamente pH 5.0, 5.5, 6.0 y 6.5. Por "citrato" se entiende un amortiguador que comprende una sal de ácido cítrico. En una modalidad preferida, el contra ión citrato es el catión de sodio, y así el componente amortiguador de citrato es citrato de sodio. Sin embargo, cualquier catión se espera que sea efectivo. Otros cationes de citrato posibles incluyen, pero no se limitan a, potasio, amonio, calcio, y magnesio. Como se anotó anteriormente, un amortiguador de citrato/ácido cítrico comprende una mezcla de ácido (es decir, ácido cítrico) y la forma de sal del ácido (es decir, citrato), donde el contra ión en la forma de sal del ácido puede ser cualquier catión adecuado. En una de tales modalidades, el contra ión para la forma de sal del ácido es el catión de sodio, y de esta manera el agente amortiguador comprende una mezcla de ácido cítrico y de citrato de sodio. Como se anotó anteriormente, la concentración del amortiguador de citrato/ácido cítrico puede ser de 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, 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 del amortiguador de citrato/ácido cítrico es desde 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, o aproximadamente 15 mM.

En otras modalidades, la composición farmacéutica líquida comprende un anticuerpo antagonista anti-CD40 tal como un anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o un fragmento de

unión a antígeno de éste, a una concentración de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 50.0 mg/ml, aproximadamente 5.0 mg/ml a aproximadamente 35.0 mg/ml, aproximadamente 10.0 mg/ml a aproximadamente 35.0 mg/ml, o aproximadamente 10.0 mg/ml a aproximadamente 20.0 mg/ml; una cantidad de arginina-HCl para hacer la composición aproximadamente isotónica; y el agente amortiguador es un amortiguador de citrato/ácido cítrico en una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, preferiblemente aproximadamente 10 mM. En aún otras modalidades, la composición farmacéutica líquida comprende un anticuerpo antagonista anti-CD40 tal como un anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o un fragmento de unión a antígeno de éste, a una concentración de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 50.0 mg/ml, aproximadamente 5.0 mg/ml a aproximadamente 35.0 mg/ml, aproximadamente 10.0 mg/ml a aproximadamente 35.0 mg/ml, o aproximadamente 10.0 mg/ml a aproximadamente 20.0 mg/ml; una cantidad de arginina-HCl para hacer la composición aproximadamente isotónica; y el agente amortiguador es un amortiguador de citrato de sodio/ácido cítrico a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, preferiblemente aproximadamente 10 mM.

En algunas modalidades preferidas, la composición farmacéutica líquida comprende un anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o un fragmento de unión a antígeno de éste; un agente amortiguador para mantener el pH de la composición farmacéutica

dentro del rango de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0; y la concentración de arginina-HCl es aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM. En algunas de estas modalidades, el agente amortiguador es amortiguador de citrato de sodio/ácido cítrico a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, la composición 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 a antígeno de éste, y la composición farmacéutica tiene un pH de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0 a aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 6.5, o aproximadamente pH 5.5 a aproximadamente pH 6.0. En otras modalidades, la composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o un fragmento de unión a antígeno de éste, a una concentración de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 50.0 mg/ml, aproximadamente 5.0 mg/ml a aproximadamente 35.0 mg/ml, o aproximadamente 10.0 mg/ml a aproximadamente 35.0 mg/ml, incluyendo aproximadamente 10.0 mg/ml, aproximadamente 15.0 mg/ml, aproximadamente 20.0 mg/ml, aproximadamente 25.0 mg/ml, aproximadamente 30.0 mg/ml, o aproximadamente 35.0 mg/ml; aproximadamente 150 mM de arginina-HCl; y el agente amortiguador es aproximadamente 10 mM de amortiguador de citrato de sodio/ácido cítrico; donde la formulación tiene un pH de aproximadamente pH 5.5

La degradación de la proteína debido al congelamiento descongelamiento o al corte mecánico durante el procesamiento de las formulaciones farmacéuticas líquidas de la presente invención

se puede inhibir mediante la incorporación de tensoactivos en la formulación con el fin de disminuir la tensión superficial en la interfaz solución-aire. Así, en algunas modalidades, la composición farmacéutica líquida comprende un anticuerpo
5 antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o un fragmento de unión a antígeno de éste; un agente amortiguador para mantener el pH de la composición farmacéutica dentro del rango de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0; una cantidad de arginina-HCl para
10 hacer la composición farmacéutica líquida aproximadamente isotónica; y además comprende un tensoactivo. En otras modalidades, la composición farmacéutica líquida comprende un anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o un fragmento de unión a
15 antígeno de éste; un agente amortiguador para mantener el pH de la composición farmacéutica dentro del rango de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0; arginina-HCl a una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM, o
aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM; y además
20 comprende un tensoactivo.

Los tensoactivos típicos empleados son tensoactivos no iónicos, que incluyen ésteres de polioxietileno sorbitol tal como polisorbato 80 (Tween 80) y polisorbato 20 (Tween 20); ésteres de
25 polioxipropileno-polioxietileno tal como Pluronic F68; alcoholes de polioxietileno tal como Brij 35; simeticona; polietilenglicol tal como PEG400; lisofosfatidilcolina; y polioxietileno-p-t-octilfenol tal como Triton X-100. La estabilización clásica de los farmacéuticos mediante tensoactivos o emulsificadores se

describe por ejemplo, en Levine et al. (1991) *J. Parenteral Sci. Technol.* 45(3):160-165, incorporada aquí como referencia. Un tensoactivo preferido empleado en la práctica de la presente invención es el polisorbato 20 o el polisorbato 80. Donde se incluye un tensoactivo, éste se agrega típicamente en una cantidad desde aproximadamente 0.001% a aproximadamente 1.0%, aproximadamente 0.001% a aproximadamente 0.5%, aproximadamente 0.001% 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 0.01% 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%, donde los porcentajes están sobre una base de peso/volumen (p/v).

Así, en algunas modalidades, la composición farmacéutica líquida comprende un anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o un fragmento de unión a antígeno de éste; el agente amortiguante es un amortiguador de citrato/ácido cítrico, por ejemplo, un amortiguador de citrato de sodio/ácido cítrico, 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 composición tiene un pH de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0, aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 6.5, o aproximadamente pH 5.5 a

aproximadamente pH 6.0; la arginina-HCl está presente a una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM, o aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM; y la composición farmacéutica comprende además un tensoactivo, por ejemplo, polisorbato 20, en una cantidad desde aproximadamente 0.001% a aproximadamente 1.0% (p/v) o aproximadamente 0.001% a aproximadamente 0.5% (p/v). En otras modalidades, la composición farmacéutica líquida comprende un anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o un fragmento de unión a antígeno de éste, a una concentración de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 50.0 mg/ml, aproximadamente 5.0 mg/ml a aproximadamente 35.0 mg/ml, o aproximadamente 10.0 mg/ml a aproximadamente 35.0 mg/ml, que incluyen aproximadamente 10.0 mg/ml, aproximadamente 15.0 mg/ml, aproximadamente 20.0 mg/ml, aproximadamente 25.0 mg/ml, aproximadamente 30.0 mg/ml, o aproximadamente 35.0 mg/ml; aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM de arginina-HCl, incluyendo aproximadamente 150 mM de arginina-HCl; el agente amortiguante es amortiguador de citrato de sodio/ácido cítrico a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM, incluyendo aproximadamente 10 mM; y la composición farmacéutica opcionalmente comprende un tensoactivo, por ejemplo, polisorbato 20, en una cantidad desde aproximadamente 0.001% a aproximadamente 1.0% (p/v), incluyendo aproximadamente 0.001% a aproximadamente 0.5% (p/v), aproximadamente 0.01% a aproximadamente 0.25% (p/v), aproximadamente 0.025% a aproximadamente 0.2% (p/v), aproximadamente 0.025% a aproximadamente 0.1% (p/v), o aproximadamente 0.05% a

aproximadamente 0.2% (p/v); donde la composición farmacéutica líquida tiene un pH de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0, aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 6.0, aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 5.5, aproximadamente pH 5.5 a aproximadamente pH 6.5, aproximadamente pH 5.5 a aproximadamente pH 6.0, o aproximadamente pH 5.5.

La composición farmacéutica líquida puede estar esencialmente libre de cualquier conservante y otros portadores, excipientes, o estabilizadores. Alternativamente, la composición farmacéutica puede incluir opcionalmente uno o más conservantes, por ejemplo, agente antibacterianos, portadores farmacéuticamente aceptables, excipientes, o estabilizadores descritos en cualquier otra parte aquí siempre y cuando ellos no afecten adversamente la estabilidad fisicoquímica del anticuerpo anti-CD40 o del fragmento de unión a antígeno de éste. Ejemplos de portadores, excipientes, y estabilizadores aceptables incluyen, pero no se limitan a, agentes amortiguantes adicionales, co-disolventes, tensoactivos, antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina, agentes quelantes tales como EDTA, complejos de metal (por ejemplo, complejos de proteína Zn), y polímeros biodegradables tales como poliésteres. Una discusión completa de la formulación y selección de los portadores, estabilizadores, e isomolitos farmacéuticamente aceptables se puede encontrar en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (18th ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990), incorporada aquí como referencia.

Así, en una modalidad, las composiciones farmacéuticas líquidas que contienen el anticuerpo antagonista anti-CD40 de la invención comprenden además el amino ácido metionina para inhibir la oxidación de los residuos de amino ácido oxidables dentro de las cadenas de polipéptido de anticuerpo. Por "inhibir" se entiende la acumulación mínima de especies oxidadas durante el tiempo. Inhibir la oxidación da como resultado la mayor retención del anticuerpo antagonista anti-CD40 en su forma molecular adecuada. Se puede utilizar cualquier estereoisómero de metionina (el isómero L, D, o DL) o combinaciones de éstos. La cantidad que se va a agregar debe ser una cantidad suficiente para inhibir la oxidación de los residuos de amino ácido oxidables de tal forma que la cantidad de las especies oxidadas es aceptable a las agencias regulatorias. Típicamente, esto significa que la composición contiene no más de aproximadamente 10% a aproximadamente 30% de productos de oxidación. En general, esto se puede lograr al agregar metionina de tal forma que la proporción de la metionina agregada a los residuos de metionina varía desde aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1000:1, más preferiblemente 10:1 a aproximadamente 100:1.

La cantidad preferida de metionina que se va a agregar se puede determinar fácilmente de manera empírica al preparar la composición que comprende el anticuerpo antagonista anti-CD40 de interés, o el fragmento de unión a antígeno de éste, con concentraciones diferentes de metionina y determinar el efecto relativo sobre la formación de especies oxidativas del polipéptido utilizando, por ejemplo, separación cromatográfica de las especies moleculares y la identificación utilizando los

estándares de peso molecular de polipéptido, tal como RP-HPLC, o la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) como se describe adelante en el Ejemplo 1. Esa concentración de metionina que maximiza la inhibición de la oxidación de los residuos de amino
5 ácido oxidables, sin tener efectos adversos sobre la inhibición relacionada con el amino ácido de la agregación de anticuerpo, representaría una cantidad preferida de metionina que se va a agregar a la composición para mejorar adicionalmente la estabilidad del anticuerpo.

10

Así, en algunas modalidades de la invención, la composición farmacéutica líquida comprende un anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o un fragmento de unión a antígeno de éste; el agente
15 amortiguante es un amortiguador de citrato/ácido cítrico, por ejemplo, un amortiguador de citrato de sodio/ácido cítrico, 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 composición farmacéutica tiene un
20 pH de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0, aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 6.5, o aproximadamente pH 5.5 a aproximadamente pH 6.0; la arginina-HCl está presente a una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 100 mM a aproximadamente
25 200 mM, o aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM; un tensoactivo está presente, por ejemplo, polisorbato 20 o polisorbato 80, en una cantidad desde aproximadamente 0.001% a aproximadamente 1.0% (p/v), o aproximadamente 0.001% a aproximadamente 0.5% (p/v); y la composición farmacéutica

comprende además metionina en una concentración de aproximadamente 0.5 mM a aproximadamente 20.0 mM, aproximadamente 0.5 mM a aproximadamente 10.0 mM, aproximadamente 1.0 mM a aproximadamente 20.0 mM, aproximadamente 1.0 mM a aproximadamente 10.0 mM, aproximadamente 1.0 mM a aproximadamente 7.0 mM, aproximadamente 2.0 mM a aproximadamente 6.0 mM, o aproximadamente 2.5 mM a aproximadamente 5.0 mM. En otras modalidades, la composición farmacéutica líquida comprende un anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o un fragmento de unión a antígeno de éste, a una concentración de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 50.0 mg/ml, aproximadamente 5.0 mg/ml a aproximadamente 35.0 mg/ml, o aproximadamente 10.0 mg/ml a aproximadamente 35.0 mg/ml, incluyendo aproximadamente 10.0 mg/ml, aproximadamente 15.0 mg/ml, aproximadamente 20.0 mg/ml, aproximadamente 25.0 mg/ml, aproximadamente 30.0 mg/ml, o aproximadamente 35.0 mg/ml; aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM de arginina-HCl, incluyendo aproximadamente 150 mM de arginina-HCl; el amortiguador de citrato de sodio/ácido cítrico a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM, incluyendo aproximadamente 10 mM; opcionalmente un tensoactivo, por ejemplo, polisorbato 20, en una cantidad desde aproximadamente 0.001% a aproximadamente 1.0% (p/v), incluyendo aproximadamente 0.001% a aproximadamente 0.5% (p/v), aproximadamente 0.01% a aproximadamente 0.25% (p/v), aproximadamente 0.025% a aproximadamente 0.2% (p/v), aproximadamente 0.025% a aproximadamente 0.1% (p/v), o aproximadamente 0.05% a aproximadamente 0.2% (p/v); y opcionalmente metionina, por

ejemplo, en una concentración de aproximadamente 0.5 mM a aproximadamente 10.0 mM, aproximadamente 1.0 mM a aproximadamente 7.0 mM, aproximadamente 2.0 mM a aproximadamente 6.0 mM, o aproximadamente 2.5 mM a aproximadamente 5.0 mM, incluyendo
5 aproximadamente 2.0 mM, aproximadamente 2.5 mM, aproximadamente 3.0 mM, aproximadamente 3.5 mM, aproximadamente 4.0 mM, aproximadamente 4.5 mM, aproximadamente 5.0 mM, o aproximadamente 5.5 mM; donde la composición farmacéutica líquida tiene un pH de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0, aproximadamente
10 pH 5.0 a aproximadamente pH 6.0, aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 5.5, aproximadamente pH 5.5 a aproximadamente pH 6.5, aproximadamente pH 5.5 a aproximadamente pH 6.0, o aproximadamente pH 5.5.

15 En aún otras modalidades, la composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o un fragmento de unión a antígeno de éste, a una concentración de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 50.0 mg/ml, aproximadamente 5.0 mg/ml a aproximadamente 35.0 mg/ml, o
20 aproximadamente 10.0 mg/ml a aproximadamente 35.0 mg/ml, incluyendo aproximadamente 10.0 mg/ml, aproximadamente 15.0 mg/ml, aproximadamente 20.0 mg/ml, aproximadamente 25.0 mg/ml, aproximadamente 30.0 mg/ml, o, aproximadamente 35.0 mg/ml; aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM de arginina-HCl,
25 incluyendo aproximadamente 150 mM de arginina-HCl; amortiguador de citrato de sodio/ácido cítrico a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM, incluyendo aproximadamente 10 mM; opcionalmente un tensoactivo, por ejemplo, polisorbato 20, en una cantidad desde aproximadamente 0.025% a

aproximadamente 0.1 % (p/v); y opcionalmente metionina, por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 2.0 mM a aproximadamente 5.5 mM, incluyendo aproximadamente 5.0 mM; donde la composición farmacéutica líquida tiene un pH de 5 aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 6.0, incluyendo aproximadamente pH 5.5.

Además de aquellos agentes descritos anteriormente, otros agentes . estabilizantes, tales como albúmina, ácido etilenodiaminatetracético (EDTA) o una de sus sales tales como EDTA de disodio, se pueden opcionalmente agregar para mejorar adicionalmente la estabilidad de las composiciones farmacéuticas líquidas. Donde es deseable, la cantidad de albúmina se puede agregar a concentraciones de aproximadamente 1.0% p/v o menos. El EDTA actúa como un absorbedor de iones de metal conocidos por catalizar muchas reacciones de oxidación, suministrando así un agente estabilizante adicional. Donde es deseable, la cantidad de EDTA se puede agregar a concentraciones de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 5.0 mM.

Donde es deseable, los azúcares o los alcoholes de azúcar también se pueden incluir en las composiciones farmacéuticas que contienen anticuerpo antagonista anti-CD40 líquidas estabilizadas de la presente invención. Se puede utilizar cualquier azúcar tal como mono, di, o polisacáridos, o glucanos solubles en agua, incluyendo por ejemplo fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, dextrano, pululan, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, almidón hidroxietilo y carboximetilcelulosa-Na. La sacarosa es el aditivo de azúcar más

preferido. El alcohol de azúcar se define como un hidrocarburo C4-C8 que tiene un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galcititol, dulcitol, xilitol, y arabitom siendo el manitol el aditivo de alcohol de azúcar más preferido.

5 Los azúcares o alcoholes de azúcar mencionados anteriormente se pueden utilizar individualmente o en combinación. No se fija límite a la cantidad utilizada, en tanto que el azúcar o el alcohol de azúcar es insoluble en la preparación líquida y no afecta adversamente los efectos estabilizantes logrados
10 utilizando los métodos de la invención. Preferiblemente, la concentración de azúcar o de alcohol de azúcar está entre aproximadamente 1.0% y aproximadamente 15.0% (p/v), más preferiblemente entre aproximadamente 2.0% y aproximadamente 10.0% (p/v).

15 Después de que se prepara la composición farmacéutica líquida descrita aquí, ésta se puede liofilizar para evitar la degradación. Los métodos para liofilizar composiciones líquidas se conocen por aquellos expertos en la técnica. Justo antes del
20 uso, la composición se puede reconstituir 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 se
25 conocen por aquellos expertos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas que contienen el anticuerpo antagonista anti-CD40 líquido de la invención son estables y así incrementan la estabilidad de almacenamiento con relación a las

composiciones de anticuerpo antagonista anti-CD40 preparadas en soluciones amortiguadas que comprenden cloruro de sodio como el agente isotonizante. Sin estar ligados por la teoría, se cree que la estabilidad de almacenamiento creciente se observa en la formulación líquida, sea almacenada directamente en esa forma para uso posterior, almacenada en estado congelado y descongelada antes de uso, o preparada en una forma seca, tal como liofilizada, secada al aire, o en forma secada por rociado; para la reconstitución posterior en una forma líquida u otra forma antes de uso. Preferiblemente, las composiciones de la invención se almacenan directamente en su forma líquida para tomar ventaja completa de la conveniencia de tener una estabilidad de almacenamiento creciente en la forma líquida, fácil de administración sin reconstitución, y la capacidad de suministrar la formulación en jeringas listas para uso prellenadas o como preparaciones multidosis si la formulación es compatible con agentes bacterioestáticos.

Las composiciones de la invención se relacionan con el descubrimiento de que el uso de la arginina-HCl como un agente isotonizante y una mezcla de un ácido y su forma de sal, tal como citrato de sodio/ácido cítrico, como el agente amortiguante da como resultado una composición farmacéutica que contiene anticuerpo antagonista anti-CD40 que tiene una estabilidad de almacenamiento creciente con relación a la composición farmacéutica que contiene anticuerpo antagonista anti-CD40 líquida preparado con cloruro de sodio y con el respectivo agente amortiguante. La estabilidad de almacenamiento creciente de la composición se logra a través de la influencia de la forma ácida

de la arginina sobre la estabilidad del anticuerpo antagonista anti-CD40 terapéuticamente activa, más particularmente su influencia sobre la agregación de polipéptido, la fragmentación, y la desamidación durante el almacenamiento en las formulaciones líquidas. Además, la incorporación de la arginina-HCl como un agente isotonizante en una composición de anticuerpo antagonista anti-CD40 líquida amortiguada de la manera establecida aquí da como resultado composiciones farmacéuticas líquidas que están aproximadamente isotónicas sin tener que incluir agentes isotonizantes adicionales, tales como cloruro de sodio.

La forma ácida de la arginina incorporada en las composiciones farmacéuticas líquidas estables de la invención protege el anticuerpo antagonista anti-CD40 terapéuticamente activo o el fragmento de unión a antígeno de éste contra cambios físicos y químicos, incrementando de esta manera la estabilidad del anticuerpo durante el almacenamiento de la composición. Por "estabilidad creciente" se entiende que uno o más de la formación de agregado, fragmentación, y desamidación por el anticuerpo durante el almacenamiento de la composición farmacéutica líquida disminuye con relación a aquella observada durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida que comprende el anticuerpo antagonista anti-CD40 y los mismos componentes de formulación con la excepción de la ausencia de este agente isotonizante y estabilizante particular. El efecto de la arginina-HCl sobre la agregación del anticuerpo antagonista anti-CD40 durante el almacenamiento en una composición líquida se puede determinar fácilmente al medir el cambio en el anticuerpo soluble anti-CD40 en solución durante el tiempo. La cantidad de

anticuerpo anti-CD40 soluble en la solución se puede cuantificar mediante el número de ensayos analíticos adaptados para la detección del anticuerpo de interés. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, la fase inversa (RP)-HPLC, la exclusión de tamaño (SEC)-HPLC, y la absorbancia de UV. La agregación también se puede monitorear utilizando SDS-PAGE. Ver también los Ejemplos de adelante.

En el caso de la agregación, una cantidad efectiva de la arginina-HCl para incorporarse dentro de la composición farmacéutica líquida que contiene el anticuerpo antagonista anti-CD40 para obtener las composiciones farmacéuticas estables de la invención se visualizarían como una cantidad que resultaría en una formación de agregado disminuida durante el tiempo, y de esta manera la mayor retención del anticuerpo antagonista anti-CD40 soluble en la solución en su forma molecular biológicamente activa no agregada. Así, por ejemplo, donde el anticuerpo antagonista anti-CD40 es el anticuerpo monoclonal anti-CD40 CHIR-12.12 descrito en los Ejemplos de adelante, una cantidad efectiva de arginina-HCl para uso en preparar una composición estable de la invención sería una cantidad que resultaría en la mayor retención del anticuerpo CHIR-12.12 en su forma molecular monomérica.

Sin estar ligados por la teoría, la estabilidad de almacenamiento creciente de las composiciones que contienen anticuerpo antagonista anti-CD40 líquidas estables de la invención también se pueden asociar con los efectos inhibitorios de la arginina-HCl sobre la fragmentación y/o desamidación del

anticuerpo de glutamina y/o los residuos de asparagina dentro del anticuerpo terapéuticamente activo durante el almacenamiento. El efecto de la arginina-HCl sobre la fragmentación de anticuerpo se puede determinar fácilmente al monitorear los cambios en las especies moleculares dentro de la formulación durante el tiempo, por ejemplo, utilizando análisis SDS-PAGE y/o SEC-HPLC; ver los Ejemplos de adelante. El efecto de la arginina-HCl sobre la desamidación del polipéptido de anticuerpo anti-CD40 durante el almacenamiento en una composición líquida se puede determinar fácilmente al monitorear la cantidad del anticuerpo antagonista anti-CD40 presente en su forma desamidada durante el tiempo. Los métodos para medir las especies moleculares, es decir, nativo o desamidado, de un polipéptido presente en la fase de solución se conocen generalmente en la técnica. Tales métodos incluyen la separación cromatográfica de las especies moleculares y la identificación utilizando estándares de peso molecular de polipéptido, tales como RP-HPLC, o cromatografía de intercambio de catión (CIEEX-HPLC) como se describe en los Ejemplos de adelante.

20

Las composiciones farmacéuticas que contienen el anticuerpo antagonista anti-CD40 líquidas estables de la invención pueden contener otros compuestos que incrementan la efectividad o promueven las calidades deseables del anticuerpo antagonista anti-CD40 de interés que sirve como un componente terapéuticamente activo en tanto que el efecto estabilizante primario logrado con la arginina-HCl no se afecte adversamente. La composición debe ser segura para la administración por vía de

25

la ruta que se escoge, ésta debe ser estéril, y debe retener su actividad terapéutica deseada.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se
5 pueden preparar, por ejemplo, al premezclar los agentes
estabilizantes y amortiguantes, y otros excipientes, antes de la
incorporación del anticuerpo antagonista anti-CD40 de interés.
Cualquier excipiente adicional que se puede agregar para
estabilizar adicionalmente las composiciones de la presente
10 invención no deben afectar adversamente los efectos
estabilizantes del agente isotonizante y estabilizante primario,
es decir, la arginina-HCl, además en combinación con el agente
amortiguante, como se utiliza para obtener las composiciones
novedosas descritas aquí. Luego de la adición de la arginina-HCl
15 para lograr la aproximada isotonicidad y la estabilidad creciente
del anticuerpo antagonista anti-CD40 de interés, el pH de la
composición líquida se ajusta utilizando el agente amortiguante,
preferiblemente dentro de un rango descrito aquí, más
preferiblemente al pH óptimo para el anticuerpo antagonista anti-
20 CD40 de interés, por ejemplo, un pH entre aproximadamente pH 5.0
y pH 7.0, preferiblemente aproximadamente pH 5.5, para el
anticuerpo monoclonal CHIR-12.12. Aunque el pH se puede ajustar
luego de la adición del anticuerpo antagonista anti-CD40 en la
composición, preferiblemente éste se ajusta antes de la adición
25 de este polipéptido, en la medida en que este puede reducir el
riesgo de desnaturalización del polipéptido. Los dispositivos
mecánicos apropiados son entonces utilizados para lograr una
mezcla adecuada de los constituyentes.

Así, la presente invención suministra un método para incrementar la estabilidad de un anticuerpo antagonista anti-CD40, o un fragmento de unión a antígeno de éste, en una composición farmacéutica líquida. El método comprende combinar el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento de unión a antígeno de éste con un agente amortiguante que mantiene la composición farmacéutica a un pH entre aproximadamente pH 5.0 y pH 7.0, y una cantidad de arginina-HCl suficiente para hacer la composición aproximadamente isotónica. En algunas modalidades, el agente amortiguante es un amortiguador de citrato/ácido cítrico, la concentración del agente amortiguante es de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM, y la cantidad de arginina-HCl suministra una concentración de este agente isotonizante dentro de la composición de entre aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM de arginina-HCl. En otras modalidades, el anticuerpo antagonista anti-CD40 es el anticuerpo CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o el fragmento de unión a antígeno de éste; el agente amortiguante es aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM de amortiguador de citrato de sodio/ácido cítrico; la concentración de arginina-HCl dentro de la composición es aproximadamente 150 mM, y la composición tiene un pH de aproximadamente 5.0, aproximadamente 5.5, aproximadamente 6.0, o aproximadamente 6.5.

La composición farmacéutica líquida estabilizada estabilizada que comprende el anticuerpo antagonista anti-CD40 de interés, por ejemplo, un anticuerpo antagonista anti-CD40 tal como el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o el fragmento de unión a antígeno de éste se deben formular en una dosis unitaria y puede estar en una forma inyectable o infundible

tal como una solución, suspensión, o emulsión. Como se anotó previamente, ésta se puede almacenar congelada o preparada en forma seca, tal como un polvo liofilizado, que se puede reconstituir en la solución, suspensión, o emulsión líquida antes
5 de la administración mediante cualquiera de los varios métodos que incluyen las rutas de administración oral o parenteral. Preferiblemente éste se almacena en la formulación líquida para tomar ventaja de la estabilidad de almacenamiento creciente lograda de acuerdo con los métodos de la presente invención como
10 se subraya adelante. La composición farmacéutica estabilizada se esteriliza preferiblemente mediante la filtración de membrana y se almacena en recipientes de dosis unitaria o multi-dosis tales como frascos o ampollas selladas. Los métodos adicionales para formular una composición farmacéutica generalmente conocidos en
15 la técnica se pueden utilizar para mejorar adicionalmente la estabilidad de almacenamiento de las composiciones farmacéuticas líquidas descritas aquí siempre y cuando ellas no afecten adversamente los efectos benéficos de los agentes estabilizantes y amortiguantes preferidos descritos anteriormente aquí. Una
20 discusión completa de la formulación y selección de los portadores, estabilizadores farmacéuticamente aceptables, etc., se puede encontrar en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (1990) (18th ed., Mack Pub. Co., Eaton, Pennsylvania), incorporada aquí como referencia.

25

De esta manera, la presente invención suministra un artículo de manufactura que comprende un recipiente que mantiene una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo antagonista anti-CD40 líquido estable de la invención, y comprende

opcionalmente instrucciones para su uso. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, botellas, y jeringas. El recipiente se puede formar de una variedad de materiales, tales como plástico o vidrio. En una modalidad, el recipiente es un frasco de vidrio para uso único de 3-50 cc. Alternativamente, para una formulación lista para utilizar, el recipiente puede ser, por ejemplo, un frasco de vidrio de 3-100 cc. El recipiente mantiene la formulación y la marca sobre, o asociada con, el recipiente que puede indicar las direcciones de uso. El artículo de manufactura puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, e insertos de paquete con instrucciones para uso.

15 Los Anticuerpos Anti-CD40 en las Composiciones Farmacéuticas de la Invención

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden anticuerpos anti-CD40, particularmente los anticuerpos antagonistas anti-CD40 o los fragmentos de unión a antígeno de éstos que apuntan al receptor CD40 y que modulan el ADCC, interfieren con la señalización CD40, particularmente las sendas de señalización CD40 que se mencionan mediante la interacción del CD40 con el ligando CD40 (CD40L), o ambas. Por "antígeno CD40", "antígeno de superficie de célula CD40", "receptor CD40", o "CD40" se entiende 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)). Se han identificado dos isoformas del CD40 humano, codificadas mediante variantes de transcrito alternativamente empalmadas de este gen.

- 5 La primera isoforma (también conocida como la "isoforma larga" o la "isoforma 1") se expresa como un polipéptido precursor del amino ácido 277 (SEQ ID NO:12 (reportada primero como Acceso al GenBank No. CAA43045, e identificada como la isoforma 1 en el Acceso al GenBank No. NP_001241), codificada mediante la SEQ ID
- 10 NO:11 (ver Nos. de Acceso al GenBank 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 la "isoforma 2") se expresa como un polipéptido precursor del amino ácido 203 (SEQ ID NO:10 (Acceso al GenBank
- 15 No. NP_690593), codificada por la SEQ ID NO:9 (Acceso al GenBank No. NM_152854)), que también tiene una secuencia de señal representada por los primeros 19 residuos. Los polipéptidos precursores de estas dos isoformas del CD40 humano comparten en común sus primeros 165 residuos (es decir, los residuos 1-165 de
- 20 la SEQ ID NO:10 y la SEQ ID NO:12). El polipéptido precursor de la isoforma corta (mostrado en la SEQ ID NO:10) se codifica por una variante de transcrito (SEQ ID NO:9) que le falta un segmento modificante, que conduce a un cambio de estructura de traducción; la isoforma CD40 resultante contiene un terminal C
- 25 más corto y distinto (residuos 166-203 de la SEQ ID NO:10) de aquel contenido en la isoforma larga del CD40 (terminal C mostrado en los residuos 166-277 de la SEQ ID NO:12). Para los propósitos de la presente invención, el término "antígeno CD40",

"antígeno de superficie de célula CD40", "receptor CD40", o "CD40" comprende tanto las isoformas corta como larga del CD40.

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

Por "actividad agonista" se entienden funciones de sustancia
como un agonista. Un agonista se combina con un receptor sobre
una célula e inicia una reacción o actividad que es similar a las
15 mismas como aquellas iniciadas por el ligando natural del
receptor. Un agonista del CD40 induce cualquiera o todos, pero no
se limita a, las siguientes respuestas: proliferación y
diferenciación de célula B, producción de anticuerpo, adhesión
intercelular, generación de memoria de célula B, cambio de
20 isotipo, regulación hacia arriba de la expresión de la superficie
de la célula de la Clase II de MHC y CD80/86, y la secreción de
citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-8, IL-12, y TNF. Por
"actividad antagonista" se entiende aquellas funciones de la
sustancia como un antagonista. Un antagonista de CD40 evita o
25 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 a la unión de agonista por el
5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, preferiblemente 40%, 45%, 50%,

55%, 60%, más preferiblemente 70%, 80%, 85%, y más preferiblemente el 90%, 95%, 99%, o 100%. Los métodos para medir la especificidad de unión del ligando CD40 y la actividad antagonista de un agente terapéutico anti-CD40, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40, se conocen en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, los ensayos de unión competitiva estándar, los ensayos para monitorear la secreción de inmunoglobulina por las células B, los ensayos de proliferación de célula B, los ensayos de proliferación de célula B similares a Banchereau, los ensayos de ayudante de célula T para producción de anticuerpo, la co-estimulación de los ensayos de proliferación de célula B, y los ensayos de regulación hacia arriba de los 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. También ver, solicitudes provisionales tituladas "*Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use*," presentadas en noviembre 4, 2003, noviembre 26, 2003, y abril 27, 2004, y las Solicitudes de Patente U.S. cedidas Nos. 60/517,337 (Referencia de Abogado No. PP20107.001 (035784/258442)), 60/525,579 (Referencia de Abogado No. PP20107.002 (035784/271525)), y 60/565,710 (Referencia de Abogado No. PP20107.003 (035784/277214)), respectivamente, y la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US2004/037152 (Referencia de Abogado No. PP20107.004 (035784/282916)), también titulada "*Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use*," presentada en noviembre 4, 2004, y publicada como WO 2005/044854); cuyos contenidos de cada uno se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Por actividad agonista "significativa" se entiende una actividad agonista de por lo menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100% mayor que la actividad agonista inducida por un control negativo o de sustancia neutra según se mide en un ensayo de una respuesta de célula B. Preferiblemente, la actividad agonista "significativa" es una actividad agonista que es por lo menos 2 veces mayor o por lo menos 3 veces mayor que la actividad agonista inducida por un control negativo o de sustancia neutra según se mide en un ensayo de respuesta de célula B. Así, por ejemplo, donde la respuesta a la célula B de interés es la proliferación de la célula B, la actividad agonista "significativa" sería la inducción de un nivel de proliferación de célula B que es por lo menos 2 veces mayor o por lo menos 3 veces mayor que el nivel de proliferación de célula B inducido por un control negativo o de sustancia neutra. En una modalidad, una inmunoglobulina no específica, por ejemplo el IgG1, que no se une al CD40 sirve como el control negativo. Una sustancia "libre de actividad agonista significativa" exhibiría una actividad agonista de no más del 25% mayor que la actividad agonista inducida por un control negativo o de sustancia neutra, preferiblemente no más de aproximadamente 20% mayor, 15% mayor, 10% mayor, 5% mayor, 1% mayor, 0.5% mayor, o aún no más de aproximadamente 0.1% mayor que la actividad agonista inducida por un control negativo o de sustancia neutra según se mide en un ensayo de respuesta de célula B.

En algunas modalidades de la invención, las composiciones farmacéuticas líquidas estables de la invención comprenden un anticuerpo antagonista anti-CD40. Tales anticuerpos están libres

de actividad agonista significativa como se anotó anteriormente cuando se unen a un antígeno CD40 sobre una célula humana. En una modalidad de la invención, el anticuerpo antagonista anti-CD40 está libre de actividad agonista significativa en una respuesta celular. En otra modalidad de la invención, el anticuerpo antagonista anti-CD40 está libre de actividad agonista significativa en ensayos de más de una respuesta celular (por ejemplo, proliferación y diferenciación, o proliferación, diferenciación, y, para las células B, producción de anticuerpo). En algunas modalidades de la invención, el anticuerpo antagonista anti-CD40 es, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal completamente humano CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o un fragmento de unión a antígeno de éste, como se anota aquí adelante.

Cualquiera de los ensayos conocidos en la técnica se puede utilizar para determinar si un anticuerpo antagonista anti-CD40 actúa como un antagonista de una o más respuestas de célula B. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD40 actúa como un antagonista de por lo menos una respuesta de célula B seleccionada del grupo que consiste de proliferación de célula B, diferenciación de célula B, producción de anticuerpo, adhesión intercelular, generación de memoria de célula B, cambio de isotipo, regulación hacia arriba de la expresión de la superficie de la célula de la Clase II de MHC y CD80/86, y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-8, IL-12, y TNF. De particular interés son los anticuerpos antagonistas anti-CD40 que están libres de actividad agonista significativa con respecto a la proliferación de la célula B cuando se une al antígeno CD40 humano sobre la superficie de la célula B humana.

En una de tales modalidades, el anticuerpo antagonista anti-CD40 es un antagonista de la proliferación de célula B medida mediante el ensayo de proliferación de célula B tal como aquel
5 descrito en el Ejemplo 4 de adelante, y el anticuerpo antagonista anti-CD40 estimula la proliferación de célula B a un nivel que no es más de aproximadamente 25% mayor que la proliferación de célula B inducida por un control negativo o de sustancia neutra, preferiblemente no más de aproximadamente 20% mayor, 15% mayor,
10 10% mayor, 5% mayor, 1% mayor, 0.5% mayor, o aún no más de aproximadamente 0.1% mayor que la proliferación de célula B inducida por un control negativo o de sustancia neutra.

En otras modalidades, el anticuerpo anti-CD40 es un
15 antagonista de la proliferación de célula B que se induce por otro anticuerpo anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo anti-CD40 S2C6, medido en un ensayo de proliferación de célula B tal como aquel descrito en el Ejemplo 4 aquí adelante, y el nivel de la proliferación de célula B estimulado por el otro anticuerpo anti-
20 CD40 en la presencia del anticuerpo antagonista anti-CD40 no es más de aproximadamente el 25% de la proliferación de célula B inducida por el otro anticuerpo anti-CD40 en la ausencia del anticuerpo antagonista anti-CD40 (es decir, por lo menos 75% de inhibición), preferiblemente no más de aproximadamente 20%, 15%,
25 10%, 5%, 1%, 0.5%, o aún no más de aproximadamente 0.1% de la proliferación de célula B inducida por el otro anticuerpo anti-CD40 en la ausencia del anticuerpo antagonista anti-CD40.

En aún otras modalidades, el anticuerpo anti-CD40 es un antagonista de la proliferación de célula B que se induce por la línea celular EL4B5 medida en el ensayo de activación de célula B descrito en el Ejemplo 4 aquí adelante, y el nivel de la proliferación de célula B estimulado por la línea celular EL4B5 en la presencia del anticuerpo antagonista anti-CD40 no es más de aproximadamente el 25% de la proliferación de célula B inducida por esta línea celular en la ausencia del anticuerpo antagonista anti-CD40 (es decir, por lo menos 75% de inhibición), preferiblemente no más de aproximadamente 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0.5%, o aún no más de aproximadamente 0.1% de la proliferación de la célula B inducida por esta línea celular en la ausencia del anticuerpo antagonista anti-CD40.

En aún otras modalidades, el anticuerpo anti-CD40 es un antagonista de la producción del anticuerpo inducido por célula T humana por las células B medido en el ensayo de ayudante de célula T humano para la producción de anticuerpo por las células B descrito en el Ejemplo 4 aquí adelante. De esta manera, el nivel de producción del anticuerpo IgG, la producción del anticuerpo IgM, o tanto la producción de anticuerpo IgG como IgM por las células B estimuladas por la células T en la presencia del anticuerpo antagonista anti-CD40 no es más de aproximadamente el 50% de la producción de anticuerpo respectivo por las célula B estimuladas por las células T en la ausencia del anticuerpo antagonista anti-CD40 (es decir, por lo menos 75% de inhibición), preferiblemente no más de aproximadamente 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0.5%, o aún no más de aproximadamente 0.1% de la producción

de anticuerpo respectivo por las células B estimuladas por las células T en la ausencia del anticuerpo antagonista anti-CD40.

Por "ligando CD40" se entiende cualquier péptido, polipéptido, o proteína que se pueda unir a y activar una o más de las sendas de señalización CD40. Así, los "ligandos CD40" incluyen, pero no se limitan a, las proteínas de ligando CD40 de longitud completa y variantes y fragmentos de éstos que retienen actividad suficiente para llevar a cabo la función de unión y estimular la señalización CD40 sobre las célula que expresan CD40. Las modificaciones al ligando CD40 nativo, por ejemplo, el ligando CD40 humano (CD40L; también conocidas como CD154), incluyen, pero no se limitan a, sustituciones, supresiones, truncamientos, extensiones, proteínas de fusión, fragmentos, peptidomiméticos, y similares. En algunas modalidades de la invención, el ensayo para evaluar la actividad biológica de un anticuerpo antagonista anti-CD40 incluye el uso del CD40L soluble, por ejemplo, CD40L humano recombinante soluble (Alexis Corporation, Bingham, Nottinghamshire, UK) para estimular la señalización CD40 sobre las células que expresan CD40.

Por "señalización de CD40 mediado por CD40L" se entiende cualquier actividad biológica que resulta de la interacción del receptor de superficie celular CD40 con un ligando CD40. Ejemplos de la señalización CD40 son señales que conducen a la proliferación y supervivencia de las células que expresan CD40, y la estimulación de una o más sendas de señalización CD40 dentro de las células que expresan CD40. Una "senda de señalización" CD40 o "senda de transducción de señal" pretende significar por

lo menos una reacción bioquímica, o un grupo de reacciones bioquímicas, que den como resultado de la interacción de un receptor CD40 con un ligando CD40, por ejemplo, CD40L, y que genera una señal que, cuando se transmite a través de la senda de
5 señal, conduce la activación de una o más moléculas corriente abajo en la cascada de señalización. Las sendas de transducción de señal involucran un número de moléculas de transducción de señal que conducen a la transmisión de una señal desde el receptor CD40 de superficie celular a través de la membrana del
10 plasma de una célula, y a través de una o más series de moléculas de transducción de señal, a través del citoplasma de la célula, y en algunos casos, en el núcleo de la célula. Las sendas de transducción de señal CD40 incluyen, por ejemplo, la senda de señalización AKT, que conduce a la activación del AKT, y
15 finalmente a la activación del NF- κ B por vía de la senda de señalización NF- κ B; y las sendas de señalización de proteína quinasa activada con mitógeno (MAPK), que incluyen la senda de señalización MEK/ERK y la senda de señalización MEK/p38, que conducen a la activación del ERK y p38, respectivamente. El
20 balance entre la activación y el bloqueo de estas sendas de señalización favorece la supervivencia o apoptosis celular

En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas estables de la invención comprenden anticuerpos antagonistas
25 anti-CD40 para bloquear la señalización CD40 mediada por CD40L. Para una descripción más detallada del papel de los anticuerpos antagonistas anti-CD40 en bloquear la señalización CD40 mediada por CD40L, ver, por ejemplo, solicitudes provisionales tituladas

"Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use," presentadas en noviembre 4, 2003, noviembre 26, 2003, y abril 27, 2004, y las Solicitudes de Patente U.S. cedidas Nos. 60/517,337 (Referencia de Abogado No. PP20107.001 (035784/258442)), 60/525,579 (Referencia de Abogado No. PP20107.002 (035784/271525)), y 60/565,710 (Referencia de Abogado No. PP20107.003 (035784/277214)), respectivamente, y la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US2004/037152 (Referencia de Abogado No. PP20107.004 (035784/282916)), también titulada

10 "Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use," presentada en noviembre 4, 2004, y publicada como WO 2005/044854); cuyos contenidos de cada uno se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Ver también la solicitud provisional titulada "Methods for Diagnosis and Treatment of

15 *Proliferative Disorders Mediated by CD40 Signaling*," presentadas en diciembre 9, 2005, y la Solicitud de Patente U.S. cedida No. 60/749,285 (Referencia de Abogado No. PP028035.0002 (035784/304312)), y la correspondiente Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US2006/019414 (Referencia de Abogado No.

20 PP028035.0003 (035784/311611)), presentada en mayo 18, 2006, y publicada como WO 2006/125143; y la solicitud provisional titulada "Methods for Diagnosis and Treatment of Diseases Having an Autoimmune and/or Inflammatory Component," presentadas en diciembre 9, 2005, y la Solicitud de Patente U.S. cedida No.

25 60/749,336 (Referencia de Abogado No. PP028062.0002 (035784/304311)), y la correspondiente Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US2006/019325 (Referencia de Abogado No. PP028062.0003 (035784/311608)), presentada en mayo 18, 2006, y

publicada como WO 2006/125117; cuyos contenidos de cada una se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Las composiciones farmacéuticas líquidas estables de la presente invención comprenden anticuerpos anti-CD40, particularmente anticuerpos antagonistas anti-CD40 y/o fragmentos de unión a antígeno de éstos. Los siguientes términos y definiciones aplican a tales anticuerpos.

10 "Anticuerpos" y "inmunoglobulinas" (Igs) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Los términos se utilizan como sinónimos. En algunos casos la especificidad de antígeno de la inmunoglobulina se puede conocer.

15 El término "anticuerpo" se utiliza en su sentido más amplio y cubre los anticuerpos completamente ensamblados, los fragmentos de anticuerpo que pueden unirse a antígeno (por ejemplo, Fab, F(ab')₂, Fv, anticuerpos de cadena única, diacuerpos, quimeras de anticuerpo, anticuerpos híbridos, anticuerpos biespecíficos, 20 anticuerpos humanizados, y similares), y los péptidos recombinantes que comprenden los anteriores.

Los términos "anticuerpo monoclonal" y "mAb" como se utilizan aquí se refieren a un anticuerpo obtenido de una 25 población sustancialmente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto para las posibles mutaciones de ocurrencia natural que pueden estar presentes en cantidades menores.

"Anticuerpos nativos" e "inmunoglobulinas nativas" son usualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150,000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está ligada a una cadena pesada por un enlace de disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas y los diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes de disulfuro intracadena regularmente espaciados. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido por un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Los residuos de amino ácido particulares se cree que forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y pesada.

El término "variable" se refiere al hecho de ciertas porciones de los dominios variables difieren extensivamente en la secuencia entre los anticuerpos. Las regiones variables confieren especificidad de unión de antígeno. Sin embargo, la variabilidad no está homogéneamente distribuida a través de los dominios variables de los anticuerpos. Éste 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 celulados en las

regiones de estructura (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativos comprenden cada uno cuatro regiones FR, principalmente adoptando una configuración de lámina plegada β , conectada por los tres CDR, que forman circuitos
5 conectantes, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina plegada β . Los CDR en cada cadena se mantienen en proximidad cercana por las regiones FR y, con los CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de anticuerpos (ver, Kabat et al. (1991) *NIH Publ. No. 91-3242*,
10 Vol. I, páginas 647-669). Los dominios constantes no se involucran directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben varias funciones efectuatoras, tales como la unión del receptor Fc (FcR), la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo, la iniciación
15 de la citotoxicidad dependiente de complemento, y la granulación de célula mástil.

El término "región hipervariable", cuando se utiliza aquí, se refiere a los residuos de amino ácido de un anticuerpo que son
20 responsables por la unión de antígeno. La región hipervariable comprende los residuos de amino ácido de una "región complementariamente determinante" 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
25 dominio variable de cadena pesada; Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD) y/o aquellos residuos de un "circuito hipervariable" (es decir, los residuos

26-32 (L1), 50-52 (L2), y 91-96 (L3) en el dominio variable de
cadena ligera y (H1), 53-55 (H2), y 96-101 (H3) en el dominio
variable de cadena pesada; Clothia y Lesk, (1987) *J. Mol. Biol.*
196:901-917). Los residuos de "Estructura" o "FR" son aquellos
5 residuos de dominio variable diferentes de los residuos de región
hipervariable, como se consideran aquí.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un
anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión a antígeno
10 o variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de
anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab, $F(ab')_2$, y Fv; los
diacuerpos; los anticuerpos lineales (Zapata et al. (1995)
Protein Eng. 10:1057-1062); las moléculas de anticuerpo de cadena
única; y los anticuerpos multiespecíficos formados de los
15 fragmentos de anticuerpo. La digestión de papaína de anticuerpos
produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados
fragmentos "Fab", cada uno con un sitio de unión a antígeno
único, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su
capacidad a cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina
20 produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación
de antígeno y es aún capaz de reticular antígeno.

El "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un
reconocimiento de antígeno completo y sitio de unión. Esta región
25 consiste de un dímero de un dominio variable de cadena pesada y
uno de cadena ligera en una asociación estrecha no covalente. Es
en esta configuración que los tres CDR de cada dominio variable
interactúan para definir un sitio de unión a antígeno sobre la
superficie del dímero $V_H - V_L$. Colectivamente, los seis CDR

confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, aún un dominio variable único (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDR específicos para un antígeno) tienen la capacidad de reconocer y unir el antígeno, aunque a una
5 afinidad inferior que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (C_{H1}) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' por la
10 adición de los pocos residuos en el terminal carboxi del dominio C_{H1} de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región pivote de anticuerpo. El Fab'-SH es la designación aquí para el Fab' en el cual el o los residuos de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos
15 Fab' se producen al reducir el puente disulfuro de cadena pesada del fragmento $F(ab')_2$. También se conocen otros acoplamientos químicos de los fragmentos de anticuerpo.

Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulina)
20 de cualquier especie de vertebrados se pueden asignar a uno o dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), con base en las secuencias de amino ácido de sus dominios constantes.

25 Dependiendo de la secuencia de amino ácido 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, y varias de estas pueden además dividirse en subclases (isotipos), por

ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulina se denominan alfa, delta, epsilon, gama, y mu, respectivamente. Las estructuras subunitarias y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien. Los diferentes isotipos tienen diferentes funciones efectuatoras. Por ejemplo, los isotipos IgG1, IgG3 humanos tienen actividad ADCC (citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo).

10

La palabra "etiqueta" cuando se utiliza aquí se refiere a un compuesto detectable o composición que está conjugada directa o indirectamente al anticuerpo de modo que genera un anticuerpo "marcado". La etiqueta puede ser detectable por si misma (por ejemplo etiquetas de radioisótopo o etiquetas fluorescentes) o, en el caso de una etiqueta enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto de sustrato o composición que es detectable.

15

20

Una "célula anfitriona", 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 única puede no necesariamente ser completamente idéntica en morfología o en genómica o un complemento total de ADN como la pariente original, debido a la mutación natural, accidental o deliberada.

25

"Células efectuatoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y desarrollan funciones efectuatoras. Preferiblemente, las células expresan al menos FcγRIII y llevan a cabo función efectuatora de citotoxicidad mediada por célula dependiente de antígeno (ADCC). Ejemplos de leucocitos humanos que median ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, macrófagos, eosinófilos, y neutrófilos, siendo las células PBMC y NK las preferidas. Los anticuerpos que tiene actividad ADCC son típicamente del isotipo IgG1 o IgG3. Note que en adición a aislamiento y de los anticuerpos IgG1 e IgG3, tales anticuerpos mediados por ADCC se pueden hacer mediante ingeniería de una región variable 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 liga a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano 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 inhibidor"), que tiene secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de ellos. El receptor activante FcγRIIA contiene un motivo de activación con base en inmunoreceptor de tirosina (ITAM) en su dominio citoplasmático.

El receptor inhibición FcγRIIB contiene un motivo de inhibición con base en inmunoreceptor tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático (ver Daeron (1997) *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234). Los FcR son revisados en Ravetch y Kinet (1991) *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-492 (1991); Capel et al. (1994) *Inmunomethods* 4: 25-34; y de Haas et al. (1995) *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-341. Otros FcR, que incluyen aquellos para identificados en el futuro, están abarcados 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, las células de secreción pueden ser immortalizadas mediante la 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) *J. Immunol. Methods* 100: 5-40). En el futuro, la immortalización de células B humanas puede ser lograda posiblemente mediante introducir una combinación definida de genes transformación. 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 resultó en 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

25

cercanamente a aquellos vistos en los humanos en todos los aspectos incluyendo la redistribución de genes, el ensamble, y el repertorio. Los anticuerpos humanos son expresados preferencialmente sobre los anticuerpos endógenos debido a la
5 eliminación en el segmento endógeno que evita la redistribución del gen en el sitio de murino. Tales ratones se pueden inmunizar con un antígeno de interés particular.

El suero de tales animales inmunizados se puede seleccionar
10 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 CD138 negativas y CD19 positivas. En un
15 células de mieloma y generar hibridomas como se detalló anteriormente.

En otro aspecto, tales cultivos de células B se pueden seleccionar adicionalmente en cuanto a la reactividad contra el
20 antígeno inicial, preferiblemente. Tal selección incluye el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) con la proteína objetivo/antígeno, un ensayo de competición con anticuerpos conocidos que ligan al antígeno de interés, y ligado in Vitro para transfretar CHO transitoriamente u otras células que
25 expresan el antígeno objetivo.

Los anticuerpos Monoclonales en el CD40 son conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo las secciones dedicadas al antígeno de las células B en McMichael, ed. (1987; 1989) Leukocyte Typing

III and IV (Oxford University Press, New York); las patentes U.S. Nos. 5,674,492; 5,874,082; 5,677,165; 6,056,959; WO 00/63395; las publicaciones internacionales 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. Otros anticuerpos monoclonales anti-CD40 incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-CD40 humanizados, such as SGN -40 (Tai et al. (2004) Cancer Res. 64:2846-52; la Patente U.S. No. 6,838,261), que es la forma humanizada del anticuerpo SGN-14 del anti-CD40 DE murino (Francisco et al. (2000) Cancer Res. 60:3225-31), y los anticuerpos agonistas y antagonistas descritos en la publicación de la solicitud de Patente U.S. No. 2004/0120948; incorporada aquí como referencia en su totalidad.

20

De particular interés a la presente invención son los anticuerpos antagonistas anti-CD40 o fragmentos que ligan antígeno del mismo que sirven para bloquear las señales CD40 mediadas por CD40L, y que también pueden modular el ADCC, como lo hace, por ejemplo, el anticuerpo CHIR-12.12 descrito aquí más adelante.

25

Los anticuerpos Antagonistas anti-CD40 para uso en las composiciones farmacéuticas líquidas estables de la invención

incluyen anticuerpos monoclonales o fragmentos que ligan al antígeno del mismo que son capaces de ligar específicamente al antígeno humano CD40 expresado sobre la superficie de una célula humano. En algunas modalidades, los anticuerpos antagonistas anti-CD40 dentro de las composiciones farmacéuticas líquidas estables exhiben una fuerte afinidad de ligado a sitio único para el antígeno de superficie celular CD40. tales anticuerpos monoclonales exhiben una constante de equilibrio de disociación (K_D) para el CD40 de por lo menos 10^{-5} M, por lo menos 3×10^{-5} M, preferiblemente 10^{-6} M a 10^{-7} M, más preferiblemente por lo menos 10^{-8} M hasta cerca de 10^{-12} M, medido usando el ensayo estándar tal como el Biacore™. El análisis Biacore es conocido en la técnica y los detalles de suministran en el "BIAapplications handbook". Los métodos descritos en la WO 01/27160 pueden ser usados para modular la afinidad del ligado.

De particular interés son los anticuerpos anti-CD40 que están libres de actividad agonista significativa según se definió aquí anteriormente pero que exhiben actividad antagonista cuando se ligan al antígeno CD40 sobre las células humanas, particularmente cuando se liga al antígeno CD40 en células B humanas neoplásicas. En una modalidad de la invención, el anticuerpo antagonista anti-CD40 está 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 en ensayos de más de una respuesta de célula B (por ejemplo, proliferación y diferenciación, o proliferación, diferenciación y producción de anticuerpo). Los anticuerpos monoclonales anti-CD40 adecuados

tienen regiones humanas constantes; preferiblemente ellos también tienen regiones de estructura humanizada completamente o parcialmente; y más preferiblemente son anticuerpos completamente humanos o fragmentos que ligan al antígeno del mismo. Ejemplos de
5 tales anticuerpos monoclonales son los anticuerpos designados aquí como CHIR-5.9 y CHIR-12.12.

Así, en algunas modalidades, el anticuerpo antagonista anti-CD40 presente en las composiciones farmacéuticas líquidas
10 estables de la invención es el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o los anticuerpos CHIR-12.12. los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 son anticuerpos monoclonales anti-CD40 completamente humanos del isotipo IgG₁ producidos de la línea celular hibridoma 131.2F8.5.9 (llamada aquí como línea celular 5.9) y 153.8E2.D10.D6.12.12
15 (llamada aquí la línea celular 12.12). Estas líneas celulares fueron creadas usando esplenocitos de ratones xenotípicos inmunizados que contienen sitios de cadena pesada IgG₁ humano y el sitio de cadena K humana (XenoMouse® technology; Abgenix; Fremont, California). Las células del bazo fueron fusionadas con
20 células mieloma SP2/0 de ratón (Sierra BioSource). Los hibridomas resultantes fueron sub-clonados varias veces para crear las líneas celulares monoclonales estable 5.9 y 12.12. otros anticuerpos de la invención pueden ser preparados similarmente usando ratones transgénicos para sitios de inmunoglobulina humana
25 o mediante otros métodos conocidos en la técnica y/o descritos aquí.

La secuencia de nucleótido y de aminoácido de las regiones variables del anticuerpo CHIR-12.12, y las secuencias de

aminoácidos de las regiones variables del anticuerpo CHIR-5.9 se describen aquí. Más particularmente, las secuencias de aminoácidos para las regiones delanteras, variables y constantes para la cadena liviana y la cadena pesada para el mAb CHIR- 12.12 se establecen en SEQ ID NO:2 (secuencia completa para la cadena liviana de mAb CHIR- 12.12), SEQ ID NO:4 (secuencia completa para la cadena pesada para el mAb CHIR-12.12), y SEQ ID NO:5 (secuencia completa para una variante de la cadena pesada para el mAb CHIR-12.12 establecida en la SEQ ID NO:4, en donde la variante comprende una sustitución de serina por el residuo de alanina en la posición 153 de la SEQ ID NO:4). Las secuencias nucleótidos que codifican la cadena liviana y la cadena pesada para el mAb CHIR-12.12 se establecen en la SEQ ID NO: 1 (secuencia de codificación para la cadena liviana del mAb CHIR- 12.12) y la SEQ ID NO:3 (secuencia de codificación para la cadena pesada del mAb CHIR-12.12). las secuencias de aminoácidos para las regiones líder, variable y constante de la cadena liviana y la cadena pesada del CHIR-5.9 mAb se establecen en la SEQ ID NO:6 (secuencia completa para la cadena liviana del mAb CHIR-5.9), SEQ ID NO:7 (secuencia completa para la cadena pesada del mAb CHIR-5.9), y SEQ ID NO: 8 (secuencia completa para una variante de la cadena pesada del mAb CHIR-5.9 establecida en la SEQ ID NO:7, en donde la variante comprende una sustitución de serina para el residuo alanina en la posición 158 de SEQ ID NO:7).

Adicionalmente, hibridomas que expresan el CHIR-5.9 (línea de hibridoma de ratón 131.2F8.5.9 (CMCC# 12047) y CHIR-12.12 (línea de hibridoma de ratón 153.8E2.D10.D6.12.12 (CMCC# 12056) de los anticuerpos han sido depositados con el ATCC (American Type Culture Collection; 10801 University Blvd., Manassas, Virginia

20110-2209 (USA)) en septiembre 17, 2003, con una designación de deposito de patente PTA-5542 y PTA-5543, respectivamente.

En adición a la actividad antagonista, los anticuerpos anti-
 5 CD40 para uso en las composiciones farmacéuticas líquidas estables de la presente invención pueden tener otro mecanismo de acción contra una célula de un tumor. Por ejemplo, los anticuerpos nativos CHIR-5.9 y CHIR- 12.12 tienen actividad ADCC. Alternativamente, las regiones variables de los anticuerpos CHIR-
 10 5.9 y CHIR-12.12 pueden ser expresados sobre otro isotipo de anticuerpo que tiene actividad ADCC. También es posible conjugar formas nativas, formas recombinantes, o fragmentos que ligan al antígeno del CHIR-5.9 o CHIR-12.12 a una citotoxina, un agente terapéutico, o un ión de metal radio activo o radio isótopo, como
 15 se anota aquí más adelante.

Los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 se ligan al CD40 soluble en ensayos tipo ELISA, impide el ligado del ligando del CD40 a las superficie celular CD40, y desplaza el
 20 ligando CD40 preligado, según se determino por ensayos citométricos de flujo. Los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 compiten uno con el otro para ligarse al CD40 pero no con 15B8, el anticuerpo monoclonal anti-CD40 descrito en la solicitud provisional U.S. Serial No. 60/237,556, titulada "anticuerpos
 25 Anti-CD40 humanos" presentada en octubre 2, 2000, y la solicitud internacional PCT No. PCT/US01/30857, también titulada "anticuerpos Anti-CD40 humanos", presentada en octubre 2, 2001 (documento de abogado No. PP16092.003), ambos incorporados aquí como referencia en su totalidad. Cuando se ensayo in Vitro para

los efectos sobre la proliferación de células B en sujetos humano normales, el CHIR-5.9 y CHIR-12.12 actúan como anticuerpos antagonistas anti-CD40. Más aún, el CHIR-5.9 y CHIR-12.12 no inducen proliferación fuerte de linfocitos humanos en sujetos
5 normales. Estos anticuerpos son capaces de matar células objetivas que expresan CD40 por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). La afinidad del ligado del CHIR-5.9 para el CD40 humano es 1.2×10^{-8} M y la afinidad del ligado de CHIR-12.12 es 5×10^{-10} M, según se determino por el ensayo Biacore™.

10

Otros anticuerpos antagonistas anti-CD40 que comparten las característica del ligado de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos anteriormente incluye, pero no se limitan a las siguientes: (1) anticuerpos monoclonales producidos
15 por las líneas de células y de hibridoma designadas 131.2F8.5.9 (llamadas aquí como líneas celulares 5.9) y 153.8E2.D10.D6.12.12 (llamadas aquí como líneas celulares 12.12), depositadas con el ATCC como deposito de Patente No. PTA-5542 y el depósito de Patentes No. PTA-5543, respectivamente; (2) un anticuerpo
20 monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la secuencia mostrada en la SEQ ID N0:2, la secuencia mostrada SEQ ID N0:4, la secuencia mostrada en la SEQ ID N0:5, ambos secuencias mostrados SEQ ID N0:2 y SEQ ID N0:4, y ambas secuencias mostradas en la SEQ ID
25 N0:2 y SEQ ID N0:5; (3) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las secuencias mostrada en la SEQ ID NO: 6, la secuencia mostrada en la SEQ ID N0:7, la secuencia mostrada en la SEQ ID N0:8, ambas secuencias mostradas en la SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7,

y ambas secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8;
(4) 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
5 consiste de la secuencia de nucleótido mostrada en la SEQ ID NO: 1, la secuencia de nucleótido mostrada en la SEQ ID NO: 3, y ambas secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3; (5) un anticuerpo monoclonal que liga a un epítipo capaz de ligar al anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de
10 hibridomas 5.9 o la línea celular de hibridoma 12.12; (6) un anticuerpo monoclonal que liga a un epítipo que comprende residuos 82-87 de la secuencia de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 12; (7) un anticuerpo monoclonal que compete con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 en un
15 ensayo de ligado competitivo y (8) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento que liga al antígeno del CHIR-12.12 o CHIR-5.9 o de los anticuerpos monoclonales anteriores en los puntos precedente (1)-(7), en donde el fragmento retiene la capacidad de ligar específicamente al antígeno humano CD40.

20

Aquellos versados en la técnica reconocen que los anticuerpos y los fragmentos que ligan al antígeno de estos anticuerpos descritos aquí incluyen anticuerpos y fragmentos que ligan al antígeno de los mismos que son producidos
25 recombinantemente usando métodos bien conocidos en la técnica y descritos aquí adelante, e incluyen, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 que han sido producidos recombinantemente.

Anticuerpos antagonistas anti-CD40 adicionales incluyen los anticuerpos monoclonales llamados como 5D12, 3A8 y 3C6, que son secretados por un hibridoma que tiene números de acceso ATCC HB 11339, HB 12024 y HB 11340, respectivamente. Ver, por ejemplo, la
5 Patente U.S. No. 6,315,998, incorporada aquí como referencia en su totalidad.

Otros anticuerpos antagonistas anti-CD40 son conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, el anticuerpo anti-CD40 humano
10 producido por el hibridoma designado F4-465 descrito en la publicación de la solicitud de Patente U.S. Nos. 20020142358 y 20030059427; incorporadas aquí como referencia en su totalidad. El F4-465 fue obtenido del ratón HAC (Kuroiwa et al. (2000) Nature Biotech. 10: 1086 (2000)) y que por lo tanto expresa la
15 cadena liviana lambda humana.

Producción de Anticuerpos para las Composiciones Farmacéuticas de la Invención

20 Los anticuerpos para uso en las composiciones farmacéuticas de la presente invención, por ejemplo, los anticuerpos antagonistas anti-CD40 descritos aquí, pueden ser producidos usando cualquier método de producción de anticuerpo conocido por aquellos versados en la técnica. Así, el suero policlonal puede
25 ser preparado por métodos convencionales. En general una solución que contiene el antígeno de interés, el antígeno CD40, es usado primero para inmunizar un animal adecuado, preferiblemente un ratón, rata, conejo, o cabra. Los conejos o las cabras son preferidos para la preparación de suero policlonal debido al

volumen de suero obtenible, y la disponibilidad de anticuerpos marcados anti-conejo y anti-cabra.

El suero policlonal puede ser preparado en una animal
5 transgénico, preferiblemente un ratón que lleva sitios de
inmunoglobulina humana. En una modalidad preferida, las células
Sf9 que expresan la proteína de interés, por ejemplo, CD40, son
usados como el inmunógeno. La inmunización puede también llevarse
a cabo mediante mezclar o emulsificar la solución que contiene el
10 antígeno en salina, preferiblemente en una adyuvante tal como el
adyuvante completo de Freund, e inyectar la mezcla o emulsión
parenteralmente (generalmente subcutáneamente o
intramuscularmente). Una dosis de 50-200 µg/inyección es
típicamente suficiente. La inmunización se promueve generalmente
15 2-6 semanas después con una o más inyecciones de la proteína en
salina, preferiblemente usando el adyuvante incompleto Freund.
Uno puede alternativamente generar anticuerpos por inmunización
in Vitro usando métodos conocidos en la técnica, que para el
propósito de esta invención se considera equivalente a la
20 inmunización in vivo. El antisuero policlonal es obtenido
mediante sangrado del animal inmunizado en un contenedor de
vidrio o de plástico, incubar la sangre a 25°C durante una hora,
seguido por incubar a 4°C durante 2-18 horas. El suero es
recuperado por centrifugación (por ejemplo, 1,000 x g durante 10
25 minutos). Cerca de 20-50 ml por sangrado pueden ser obtenidos de
los Conejos.

La producción de Sf 9 (*Espodoptera frugiperda*) se describe
en la Patente U.S. No. 6,004,552, incorporada aquí como

referencia. En el caso del CD40, brevemente, las secuencias que codifican el CD40 humano fueron recombinadas en un baculovirus que usan vectores de transferencia. Los plasmados fueron co-transfectados con ADN de baculovirus tipo silvestre en células Sf9. Las células Sf9 infectadas con el baculovirus recombinante fueron identificadas y purificadas por clonación.

Preferiblemente el anticuerpo es monoclonal en naturaleza. Por "anticuerpo monoclonal" se tiene el propósito de un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto de posibles mutación de ocurrencia natural que pueden estar presente en cantidades menores. El término no está limitado con respecto a las especies o fuente del anticuerpo. El término abarca inmunoglobulinas completas lo mismo que fragmentos tales como Fab, F(ab')₂, Fv, y otros que retienen la función de ligado al antígeno del anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, siendo dirigidos contra un sitio antigénico único; por ejemplo en el caso de anticuerpos anti-CD40, el antígeno de superficie celular CD40. Más aún, en contraste con preparaciones de anticuerpo convencionales (policlonal) que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos) cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un determinante único en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo según es obtenido de la población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe ser entendido como que requiere producción del anticuerpo por cualquier método particular. Por ejemplo los anticuerpos

monoclonales al ser usados de acuerdo con la presente invención pueden ser hechos por el primer método de hibridoma descrito por Kohler et al. (1975) Nature 256:495, o pueden ser hechos por métodos de ADN reconvinantes (ver, por ejemplo, la Patente U.S. No. 4,816,567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden ser aislados de librerías de anticuerpos fago que usan 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 la Patente U.S. No. 5,514,548.

Por "epítopo" se quiere significar la parte de una molécula antigénica a la cual un anticuerpo es producido y en la cual el anticuerpo se ligara. Los epítopos pueden comprender residuos lineales de aminoácidos (es decir, residuos dentro del epítopo están dispuestos secuencialmente uno después del otro de una manera lineal), residuos de aminoácidos no lineales (llamados aquí como "epítopos no lineales"; estos epítopos no están dispuestos secuencialmente), o residuos de aminoácidos tanto lineales como no lineales.

Los anticuerpos monoclonales pueden ser preparados usando el método de Kohler et al. (1975) Nature 256:495-496, o una modificación del mismo. Típicamente un ratón es inmunizado con una solución que contiene un antígeno. La inmunización puede llevarse a cabo mediante mezclas o emulsificar la solución que contiene el antígeno en salina, preferiblemente en un adyuvante tal como el adyuvante completo Freund, e inyectar la mezcla o emulsión parenteralmente. Cualquier método de inmunización conocido en la técnica puede ser usado para obtener los

anticuerpos monoclonales de la invención. Después de la inmunización del animal, el bazo (y opcionalmente algunos nodos linfáticos grandes) son removidos y disociados en células únicas. Las células de bazo pueden ser seleccionadas o tamizadas mediante aplicar una suspensión celular a un plato o pozo recubierto con el antígeno de interés. Las células B que expresan la membrana que se liga específicamente a inmunoglobulina para el ligado del antígeno a la placa y no se enjuaga. 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 cultivados en un medio selectivo. Las células resultantes se ponen en placas mediante dilución serial y son ensayadas para la producción de anticuerpos que se ligan específicamente al antígeno de interés (y que no se ligan a antígenos no relacionados). Los hibridomas que secretan el anticuerpo monoclonal seleccionado (mAb) son entonces cultivadas sea in Vitro (por ejemplo en botellas de cultivo de tejido o reactores de fibra huecos), o in vivo (como ascitas en ratones).

Donde los anticuerpos antagonistas anti-CD40 son preparados usando métodos de AND recombinantes, el AND que codifica los anticuerpos monoclonales es aislado fácilmente y secuenciado usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante usar probetas de oligonucleótidos que son capaces de ligar específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y liviana de los anticuerpos de murino. Las células de hibridoma descritas aquí sirven como fuente preferida de tal ADN una vez aislado, el ADN puede ser colocado en vectores de expresión, que son entonces transfectados dentro de las células anfitrionas

tales como células de E. coli, células COS de simio, células (CHO) de ovarios de Hámster chino, o células de mieloma que no producen de otra manera proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células anfitrionas recombinantes. Artículos de revistas sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluye Skerra et al. (1993) Curr. Opinion in Immunol. 5:256 and Phickthun (1992) Immunol. Revs. 130:151. alternativamente, los anticuerpos pueden ser producidos en una línea celular tal como una línea celular CHO, según se describió en las Patentes as U.S. Nos. 5,545,403; 5,545,405; y 5,998,144; incorporadas aquí como referencia. Brevemente la línea celular es transfectada con vectores capaces de expresar una cadena liviana y una cadena pesada, respectivamente. Por transfectar las dos proteínas en vectores separados, los anticuerpos quiméricos pueden ser producidos. Otras ventajas es 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 fragmentos que ligan al antígeno de los mismos se producen en células CHO usando sistemas de expresión de genes GS (Lonza Biologies, Portsmouth, New Hampshire), que usa glutamina sintetasa como un marcador. ver, también las 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; los contenidos de los cuales se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Adicionalmente, los anticuerpos para uso en las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser anticuerpos quiméricos que tienen las características de ligado deseadas. Así, por ejemplo, anticuerpos anti-CD40 quiméricos para uso en los métodos de la invención podrían tener las características del ligado de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos aquí. Por anticuerpos "quiméricos" se quiere decir anticuerpos que son derivados más preferiblemente usando técnicas recombinantes con ácido desoxirribonucleico y que comprenden tanto componentes humanos (incluyendo especies 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 humana y tiene la especificidad antigénica deseada al antígeno de célula de superficie CD40. La fuente no humana puede ser cualquier fuente de vertebrada que se pueda utilizar 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, Mono del Viejo Mundo, simio, etc.; ver, por ejemplo, Patente U.S. Nos. 5,750,105 y 5,756,096; incorporada aquí como referencia). Como se utiliza aquí, la frase "inmunológicamente activo" cuando se utiliza en referencia a

anticuerpos anti-CD40 quiméricos significa un anticuerpo quimérico que se une a CD40 humano.

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

Por "humanizado" se entienden formas de anticuerpo anti-CD40 que contienen secuencia mínima derivada de secuencias de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en el cual los residuos provenientes de una región hipervariable (también conocida como región determinante de complementariedad o CDR) del receptor son reemplazados por residuos provenientes de una región hipervariable de especies no humanas (anticuerpo donados) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene cualquier especificidad, afinidad y capacidad deseadas. La frase "región determinante de complementariedad" se refiere a una secuencia de aminoácido que define junto la afinidad de unión y 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 efectuadas. 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 producen 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 CDR de roedor o roedor mutante para las secuencias de CDR 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 humana se reemplazan por los correspondientes residuos no humanos (ver, por ejemplo, Patente U.S. Nos. 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; y 6,180,370). Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones son hechas para refinar adicionalmente el desempeño del anticuerpo (por ejemplo para obtener la afinidad deseada). En general, el anticuerpo humanizado comprenderá substancialmente todo o al

menos uno, y típicamente dos, dominios de variable, en los cuales substancialmente todas las regiones hipervariables corresponden a aquellas de inmunoglobulina no humana y todas o substancialmente todas las regiones de estructura de aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también opcionalmente comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente que de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales ver Jones et al. (1986) *Nature* 331: 522-525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332: 323-329; y 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 descritos aquí.

La presente invención también puede ser practicada usando anticuerpos xenogénicos o modificados producidos en un anfitrión mamífero no humano, más particularmente un ratón transgénico,

caracterizado por sitios de inmunoglobulina endógena inactivada (Ig). En tales animales transgénicos, los genes endógenos competentes para la expresión de subunidades liviana y pesada de inmunoglobulinas anfitrionas se convierten en no funcionales y sustituidos con sitios de inmunoglobulina humana análoga. Estos animales transgénicos producen anticuerpos humanos en la ausencia substancial de subunidades de inmunoglobulina anfitriona liviana o pesada. Ver, por ejemplo, Patente U.S. Nos. 5,877,397 Y 5,939,598, incorporada aquí como referencia.

En algunas modalidades, los anticuerpos completamente humanos al CD40, por ejemplo, son obtenidos mediante 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 los sitios de cadena pesada IgG1 de humano y el sitio para cadena liviana κ humano se inmunizaron con células Sf9 que expresan CD40 humano. Los ratones también pueden ser transgénicos para otros isotipos. Los anticuerpos anti-CD40 completamente humanos útiles en las composiciones farmacéuticas líquidas estables de la presente invención están caracterizados por propiedades de ligado similares a aquellas exhibidas por los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos aquí.

Los fragmentos de un anticuerpos particular de interés, por ejemplo un anticuerpo anti-CD40 incluyen el anticuerpo anti-CD40 antagonista, son adecuados para uso en las composiciones

farmacéuticas líquidas estables de la invención siempre que ellos retengan la afinidad deseada del anticuerpo de longitud completa. Así, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo anti-CD40 retendrá la habilidad para ligarse al antígeno de superficie de célula B CD40. tales fragmentos son caracterizan por propiedades similares al anticuerpo antagonista anti-CD40 de longitud completa así, 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 ligado a anticuerpo".

Los fragmentos de ligado a antígeno de adecuados de un anticuerpo comprenden una porción del anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de ligado 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 que liga a antígeno monovalente de una inmunoglobulina que está compuesta de una cadena liviana y parte de una cadena pesada. Por " $f(ab')_2$ " se propone un fragmento bivalente que liga a antígeno de una inmunoglobulina que contiene tanto cadenas livianas como parte de ambas cadenas pesadas. Por "Fv" o "sFv" como fragmentos de anticuerpos se entiende fragmentos que comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una cadena de polipéptido. 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 adicionalmente un enlazador de polipéptido entre los dominio V_H y V_L que le posibilitan al sFv formar la estructura deseada para el ligado de antígeno. Para una revisión del sFv ver Pluckthun (1994) in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, ed. Rosenberg and Moore (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315. los fragmentos que ligan a antígeno de los anticuerpos antagonista anti-CD40 descritos aquí también pueden ser conjugados a una citotóxica para efectuar el asesinato de las células de cáncer objetivo, como se describen aquí adelante.

Los anticuerpos o los fragmentos de a pueden ser aislados de librerías de anticuerpo fago 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 fago. Publicaciones subsecuentes describen al producción de 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 construir librerías 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.

Varias técnicas han sido desarrolladas 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) y Brennan et al. (1985) *Science* 229:81). Sin, embargo, estos fragmentos pueden ser ahora producidos directamente mediante células anfitrionas recombinantes, por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden ser aislados de las librerías 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 otro modelo, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de célula anfitrionas recombinante. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para los practicantes versados en la materia.

Los anticuerpos antagonistas anti-CD40 para uso en las composiciones farmacéuticas líquidas estables 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), eliminación (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 desinmunizados, particularmente los anticuerpos anti-CD40 antagonistas desinmunizados que pueden ser producidos como se describe en, por ejemplo, las 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 de interés; por ejemplo, un anticuerpo antagonista anti-CD40 o fragmentos de este, dichas 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.

Cualquier anticuerpo conocido que tenga la especificidad de ligado de interés puede tener variaciones de secuencia producidas utilizando los métodos descritos, por ejemplo, las publicaciones de Patentes 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 liga al MHC clase II y dispara una respuesta no deseada en las célula T ayudadoras. Una sustitución conservadora puede permitirle al anticuerpo retener la actividad de ligado a un perdiendo su capacidad para disparar una respuesta no deseada de las células T. 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 también pueden ser usados en

las composiciones farmacéuticas líquidas estables de la presente invención. Los anticuerpos variantes pueden ser rutinariamente ensayados en cuanto a su actividad particular, por ejemplo, actividad antagonista, afinidad, y especificidad utilizando los métodos descritos aquí.

El anticuerpo antagonista anti-CD40 producido mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente, o cualquier otro método no descrito aquí, puede ser usado de una manera similar a los anticuerpos CHIR-12.12 o CHIR-5.9 en donde este posee por lo menos una de las siguientes actividades biológicas: inhibición de secreción de inmunoglobulina mediante células B periféricas humanas 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 estimuladas por células que expresan CD40L o ligando CD40 soluble (sCD40L); inhibición de "supervivencia" de señales intracelulares anti-apoptósicas 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; eliminación, alergia y/o tolerancia de inducción de células objetivo que llevan CD40 o células que llevan ligandos cognatos al CD40 incluyendo pero sin limitarse a células T y células B; inducción de la expansión o activación de células T que regulan $CD4^+ CD24^+$ (Ver por ejemplo, el rechazo de de tejido específico a lo antígeno donante por vía de la interferencia CD40-CD40L, Van Maurik et al. (2002) J. Immunol. 169:5401-5404);

citotoxicidad por vía de cualquier mecanismo (incluyendo, pero sin limitarse a citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo(ADCC), citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), sub-regulación de proliferación, y/o apoptosis de células objetivo); modulación de la secreción de citoquina de células objetivo y/o la expresión de moléculas de superficie celular; y combinaciones de estos.

Los ensayos para medir la actividad biológica deseada de los anticuerpos antagonista anti-CD40 descritos aquí, y los fragmentos que ligan al antígeno del mismo, puede llevarse a cabo como se describió en las solicitudes provisionales tituladas "Anticuerpos Antagonistas Anti-CD 40 Monoclonal y Métodos para su Uso", presentada en Noviembre 4, 2003, Noviembre 26, 2003, y Abril 27, 2004, y asignadas a la solicitud de Patente U.S. Nos. 60/517,337 (documento de abogado No. PP20107.001 (035784/258442)), 60/525,579 (Documento de abogado No. PP20107.002 (035784/271525)), y 60/565,710 (Documento de abogado No. PP20107.003 (035784/277214)), respectivamente; y solicitud de Patente Internacional No. PCT/US2004/037152 (Documento de abogado No. PP20107.004 (035784/282916)), también titulada "Anticuerpos Antagonistas Anti-CD40 Monoclonal y Métodos para su Uso " presentada Noviembre 4, 2004, y publicada como WO 2005/044854; los contenidos de cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Ver también los ensayos descritos en la solicitud provisional titulada "Métodos para el Diagnostico y Tratamiento de Trastornos Proliferativos Mediados por Señalización CD40 " presentada Diciembre 9, 2005, y asignadas a la solicitud de Patente U.S. No. 60/749,285 (Documento de abogado

No. PP028035.0002 (035784/304312), y la solicitud de Patente internacional correspondiente No. PCT/US2006/019414 (Documento de abogado No. PP028035.0003 (035784/311611)), presentada Mayo 18, 2006, y publicada como WO 2006/125143; y la solicitud provisional titulada "Métodos de para el Diagnostico y Tratamiento y Enfermedades que tienen un componente Autoinmune y/o Inflamatorio", presentada Diciembre 9, 2005, y asignadas a la solicitud de Patente U.S. No. 60/749,336 (Documento de abogado No. PP028062.0002 (035784/304311), y la solicitud de Patente internacional correspondiente No. PCT/US2006/019325 (Documento de abogado No. PP028062.0003 (035784/311608)), presentada Mayo 18, 2006, y publicada como WO 2006/125117; los contenidos de cada una de las cuales se incorporan aquí como referencia en su totalidad. También ver los ensayos, descritos en Schultze et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8200-8204; Denton et al. (1998) *Pediatr Transplant.* 2: 6-15; Evans et al. (2000) *J. Immunol.* 164: 688-697; Noelle (1998) *Agents Actions Suppl.* 49: 17-22; Lederman et al. (1996) *Curr Opin. Hematol* 3: 77-86; Coligan et al. (1991) *Current Protocols in Immunology* 13: 12; Kwekkeboom et al. (1993) *Immunology* 79: 439-444; y Patente U.S. Nos. 5,674,492 y 5,847,082; incorporado aquí como referencia.

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

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

25

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 o etiquetas. La detección de la formación de un complejo

de anticuerpo antígeno entre un anticuerpo anti-CD40 y un epítipo de interés se puede facilitado mediante la sujeción 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 rábano, la fosfatasa alcalina, la β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes incluyen umbeliferona, fluorescina, fluoresceína, isotiocianato, rodamina, diclorotriazinilamina fluorescina, Cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente es luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequarina; y ejemplos de materiales radioactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , o ^3H . Tales reactivos marcados se pueden utilizar en una variedad de ensayos bien conocidos, tales como radioinmunoensayo de enzima, por ejemplo, ELISA, inmunoensayos fluorescentes, y similares. Ver por ejemplo Patente U.S. Nos. 3,766,162, 3,791,932; 3,817,837; y 4,233,402.

Cualquiera de los anticuerpos antagonistas anti-CD40 previamente descritos o los fragmentos de anticuerpo de esto se pueden conjugar antes del uso en los métodos de la presente 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 las etiquetas o los marcadores adecuados incluyen fluoróforos, cromóforos, átomos radioactivos (particularmente ^{32}P y ^{125}I), reactivos densos en electrones, enzimas, y ligandos que tiene socios de ligados específicos. Las enzimas son típicamente detectadas por su actividad. Por ejemplo la peroxidasa de rábano es detectada usualmente por su capacidad para convertir 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) a un pigmento azul cuantificable con un espectrofotómetro. "socio de ligado específico" se refiere a una proteína capaz de ligar una molécula de ligando con alta especificada, como por ejemplo en el caso de un antígeno y un anticuerpo monoclonal específico después. Otros socio de ligado 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 las varias etiquetas o los marcadores en distintas clases, en razón a que la misma marca puede servir en diferentes modos. Por ejemplo el ^{125}I puede servir como etiqueta radio activo o como un reactivo denso de electrón. El HRP puede servir como enzima o como un antígeno para mAb. Adicionalmente uno puede combinar varios etiquetas es para un efecto deseado. Por ejemplo, el mAbs y la avidina también requieren etiquetas en la práctica de esta invención: así, uno podría etiquetar aMb con biotina y detectar su presencia con

avidina marcada con ^{125}I , o con una anti-biotina mAb marcado 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 un "modelo de demarcación directa", donde el radionuclido está covalentemente ligado directamente a un anticuerpo (típicamente por vía de un residuo de aminoácidos). Los radionuclidos preferidos se suministran en Srivagtava y Mease (1991) *supra*. El modelo de marcaciones indirectas particularmente preferido. Ver también, por ejemplo, Publicaciones Internacionales Nos WO 00/52031 y WO 00/52473, donde se utiliza un enlazado para sujetar un etiqueta radioactiva 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.

Variantes de los Anticuerpos

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser formuladas usando variantes de un anticuerpo antagonista anti-CD40 conocido en la técnica. Tales variantes retienen las propiedades de ligado deseadas del anticuerpo pariente. Así, por ejemplo, en donde el anticuerpo antagonista anti-CD40 que va a se formulado es una variante del anticuerpo pariente CHIR- 12.12 o CHIR-5.9, el anticuerpo variante retendrá las propiedades de ligado del anticuerpo pariente CHIR- 12.12 o

CHIR-5.9. Los métodos para hacer variantes de anticuerpos 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) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488-492; Kunkel et al. (1987) *Methods Enzymol* 154: 367-382; Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, New York); Patente U. S. No. 4,873,192; y las referencias citadas aquí; incorporadas aquí como referencia. La Guía para sustituciones de aminoácido apropiadas que no afectan la actividad biológica del polipéptido de interés se pueden encontrar en el modelo de Dayhoff et al. (1978) in *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D. C.), incorporada aquí como referencia. Las sustituciones conservadoras tales como el intercambio de un aminoácido con otras que tengan propiedades similares, puede ser preferida. Ejemplos de sustituciones conservadoras incluye, pero no están limitadas a, Gly $\leftrightarrow$ Ala, Val $\leftrightarrow$ Ile $\leftrightarrow$ Leu, Asp $\leftrightarrow$ Glu, Lys $\leftrightarrow$ Argg, Asn $\leftrightarrow$ Gln, y Phe $\leftrightarrow$ TRp $\leftrightarrow$ Tyr.

Al construir variantes de un polipéptido del anticuerpo antagonista anti-CD40 de interés, el anticuerpo CHIR-12.12 o CHIR-5.9, las modificaciones son hechas de modo que las variantes continúen poseyendo la actividad deseada, es decir, afinidad de ligado similar y en el caso de los anticuerpos antagonistas anti-CD40 son capaces de ligar 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 liga a un antígeno CD40 sobre una célula que expresa CD40 humano. Obviamente, cualquier mutaciones hechas en el ADN que codifica el polipéptido variante no deben ubicar la secuencia por fuera del marco de lectura y preferiblemente no crearan regiones complementarias que pudieran producir una estructura de mRNA secundario. Ver Publicación de Solicitud de Patente EP No. 75,444.

Adicionalmente, la región constante del anticuerpo antagonista anti-CD40 se puede mutar para alterar la función efectuada de numerosas maneras. Por ejemplo, ver la Patente U.S. 6,737,056B1 y la Publicación de la Solicitud de Patente No. 2004/0132101A1, que divulga mutaciones Fc que optimizan el ligado del 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 un espacio abierto de multa 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).

Métodos de terapia Usando las Composiciones Farmacéuticas de
la Invención

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención encuentran uso en el tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer o una condición premaligna que está asociada con células que expresan CD40, o para tratar una enfermedad inflamatoria y/o una enfermedad autoinmune que está asociada con células que expresan CD40. "Tratamiento" se define aquí como la aplicación o administración de una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo antagonista anti-CD40 a un sujeto, o aplicación o administración de una composición farmacéutica que comprende anticuerpo antagonistas anti-CD40 a un tejido aislado o línea celular de un sujeto, donde el sujeto 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 "Sujeto" se quiere decir cualquier animal. Preferiblemente el sujeto es un mamífero, más preferiblemente el sujeto es humano. Los mamíferos de importancia particular diferentes al humano incluyen, pero no se limitan a perros, gatos, vacas, caballos, ovejas y marranos.

Cuando la administración tiene el propósito de tratamiento, la administración puede ser con propósitos profilácticos o

terapéuticos. Cuando se suministra profilácticamente, la composición farmacéutica se suministra antes de la aparición de cualquier síntoma. La administración profiláctica de la composición farmacéutica sirve para impedir o atenuar cualesquier síntomas subsiguientes. Cuando se suministra terapéuticamente, la composición farmacéutica es suministrada en al (o poco después) del establecimiento de un síntoma. La administración terapéutica de la composición farmacéutica sirve para atenuar cualquier síntoma real.

Las rutas típicas de administración incluyen, pero no se limitan a, administración oral y administración parenteral, incluyendo intravenosa, intramuscular, intratecal, intranasal, sublingual, intraarterial, inyección intraperitoneal o infusión e inyección subcutánea. Los métodos para llevar a cabo esta administración son conocidos por aquellos versados en la técnica.

En las modalidades preferidas, las composiciones farmacéuticas de la invención son administradas intravenosamente. La administración intravenosa ocurre preferiblemente mediante la infusión durante un periodo de alrededor de una a cerca de 10 horas, más preferiblemente desde 1 a cerca de 8 horas, y aún más preferiblemente desde 2 a cerca de 7 horas, todavía más preferiblemente desde 4 a cerca de 6 horas, dependiendo del anticuerpo antagonista anti-CD40 que se administra. La infusión inicial con la composición farmacéutica puede darse durante un periodo de alrededor de 4 a cerca de 6 horas con infusiones subsiguientes suministradas más rápidamente. Las infusiones subsiguiente pueden ser administradas durante un periodo de

alrededor de 1 a 6 horas, incluyendo, por ejemplo, alrededor de 1 a 4 horas, alrededor de 1 a 3 , o alrededor 1 a 2 horas.

Una cantidad farmacéuticamente efectiva de una composición farmacéutica de la invención es administrada a un sujeto. Por "cantidad farmacéuticamente efectiva" se quiere decir una cantidad de es útil en el tratamiento de una enfermedad o condición, en donde el tratamiento puede ser para un propósito profiláctico o terapéutico como se mencionó anteriormente. De esta manera, una cantidad farmacéuticamente efectiva de la composición será administrada en una dosis terapéuticamente efectiva o cantidad del anticuerpo antagonista anti-CD40 al sujeto que necesite el tratamiento. Por "dosis o cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad efectiva" se quiere decir una cantidad del anticuerpo antagonista anti-CD40 que, cuando se administra trae una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento de un paciente con una enfermedad que comprende células que expresan el CD40. en algunas modalidades de la invención, una dosis terapéuticamente efectiva de anticuerpo anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 O CHIR-5.9, o el fragmento que liga al antígeno del mismo, está en el rango de alrededor de 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 o desde aproximadamente 7 mg/kg a aproximadamente 12. Se reconoce que el método de tratamiento puede comprender una sola administración 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 éste.

Las composiciones farmacéuticas de la invención encuentran uso en el tratamiento de cualquier sujeto que tenga un cáncer o una condición pre-maligna que es responde al tratamiento con un agente terapéutica anti-CD40, más particularmente, un anticuerpo antagonista anti-CD40. los métodos para determinar la respuesta de una condición de cáncer o pre-maligna al tratamiento con un anticuerpo anti-CD40 incluye ensayo de diagnósticos y pronostico, por ejemplo, los ensayos descritos en la solicitud de patente provisional copendiente y propiedad de la solicitante titulada "métodos para Diagnostico y Tratamiento de Trastornos Proliferativos mediados por la señalización CD40," presentada en Diciembre 9, 2005, y cedida a la solicitud de patentes U.S. No. 60/749,285 (Documento de abogado No. PP028035.0002 (035784/304312), y su Solicitud de Patente Internacional correspondiente No.PCT/US2006/019414 (Documento de abogado No. PP028035.0003 (035784/311611)), presentada en Mayo 18, 2006, y publicada como WO 2006/125143; cuyos contenidos se encontraron aquí como referencia en su totalidad. Similarmente, la composición farmacéutica de la invención encuentra uso en el tratamiento de cualquier sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria y/o autoinmune que responde al tratamiento con una agente terapéutico anti-CD40, particularmente un anticuerpo anti-

CD40. los métodos para determinar la respuesta de una enfermedad inflamatoria y/o autoinmune al tratamiento con un anticuerpo anti-CD40 incluye ensayos de diagnósticos y pronóstico, por ejemplo, los ensayos descritos en la solicitud de patente provisional copendiente y que pertenece al este mismo solicitante titulada "Métodos para el Diagnóstico y Tratamiento de enfermedades que tienen un componente autoinmune y/o inflamatorio", presentada en Diciembre 9, 2005, y cedida a la solicitud de patente U.S. No. 60/749,336 (Documento de abogado No. PP028062.0002 (035784/304311), y su Solicitud de Patente Internacional correspondiente No. PCT/US2006/019325 (Documento de abogado No. PP028062.0003 (035784/311608)), presentada en Mayo 18, 2006, y publicada WO 2005/125117; cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

"Tumor", como se usa aquí, se refiere a todo crecimiento celular neoplásico y proliferación, sea maligno o benigno, y a todas las células y tejidos precanceroso y cancerosos.

"Neoplásico", como se usa aquí, se refiere a cualquier forma de crecimiento celular disregulado o no regulado, sea maligno o benigno, que resulte en crecimiento anormal del tejido. Así, "célula neoplásicos" incluyen células malignas y benignas que tienen crecimiento celular no regulado. Por "actividad antitumoral" se quiere decir una reducción en la velocidad de la proliferación o acumulación de células malignas que expresan el CD40, y por lo tanto una declinación en la velocidad de crecimiento de un tumor existente o en un tumor que surge durante la terapia, y/o la destrucción de células neoplásicas existentes (tumor) o

células neoplásicas recién formadas y por lo tanto una disminución en el tamaño general de un tumor durante la terapia. La terapia con las composiciones farmacéuticas que contienen el anticuerpo antagonista anti-CD40 de la invención causan una respuesta fisiológica que es benéfica con respecto al tratamiento de los cánceres y condiciones pre-malignas asociadas con la estimulación de la señalización CD40 en células que expresan el CD40 en un humano.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la condición fisiológica en los mamíferos que es caracterizada típicamente por un crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limita a, linfomas y leucemia, y a tumores sólidos. Por "cáncer relacionados con células B" O "cáncer del linaje de células B" se quiere decir cualquier tipo de cáncer en el cual el crecimiento de célula disregulado o no regulado está asociado con las célula B.

Por "refractario" en el contexto de un cáncer se quiere decir que el cáncer particular es resistente a, o no responde a la terapia con un agente terapéutico particular, por ejemplo, un anticuerpo antagonista anti-CD40 de interés. Un cáncer puede ser refractario a la terapia con un agente terapéutico particular sea desde el establecimiento del tratamiento con el agente terapéutico particular (es decir, no responde a la exposición inicial al agente terapéutico), o como un resultado del desarrollo de resistencia a al agente terapéutico, sea durante el curso de un primer periodo de tratamiento con el agente

terapéutico o durante un periodo de tratamiento subsiguiente con el agente terapéutico.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención encuentran el uso en el tratamiento de un sujeto que necesita una intervención terapéutica para una condición de cáncer o pre-maligna que está mediada por la estimulación de la señalización CD40 sobre células que expresan el CD40, o para cualquier enfermedad inflamatoria o autoinmune que es mediada por la señalización CD40 sobre células que expresan el CD40. Por "células que expresan CD40" se quiere decir células normales, pre-malignas y malignas que expresan el antígeno CD40. En algunas modalidades, la célula que expresa CD40 es una célula B maligna. Por células B "maligna" se quiere decir cualquier célula B neoplásica incluyendo pero sin limitarse a células B Derivadas de linfomas incluyendo linfomas de células B de bajo, intermedio o alto grado, linfomas inmunoplásicos, linfomas no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, el virus de Epstein-Barr (EBV) inducido por linfoma y linfomas relacionados con el Sida, lo mismo que leucemias linfoblásticas agudas de células B mielomas, leucemias linfocíticas crónicas, y similares. En otras modalidades, la célula que expresa CD40 es un carcinoma o una célula sarcoma. Por "célula carcinoma que expresa CD40" o células sarcoma de expresa CD40" se quiere decir cualquier célula carcinoma o sarcoma maligna (es decir neoplásica) o pre-maligna de un tumor sólido que expresa el antígeno en la superficie celular de CD40. Para propósitos de la presente invención, células cancerosas y pre-cancerosa o pre-maligno que expresan el antígeno CD40 se llaman "células neoplásicas que expresan CD40". Los métodos para

detectar la expresión de CD40 en las células son bien conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a, técnicas PCR, inmunohistoquímica, citometría de flujo, Western blot, ELISA, y similares. Donde el tratamiento con un anticuerpo antagonista anti-CD40 o un fragmento que liga el antígeno del mismo está garantizado, la composición farmacéutica comprende el anticuerpo antagonista anti-CD40 o el fragmento que liga al antígeno del mismo se puede administrar mediante cualquier vía adecuada de administración.

El sujeto que está en necesidad del tratamiento con una composición farmacéutica de la presente invención puede estar afligido con o tener el riesgo de desarrollar o recaer con un cualquier cáncer o condición pre-maligna que es mediada por la señalización CD40 sobre células neoplásicas que expresan el CD40. Ejemplos de tales cánceres y condiciones pre-malignas incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los cánceres del linaje de células B, malignidades hematológicas de células no B, y tumores sólidos que son conocidos por la señalización CD40 sobre células neoplásicas que expresan el CD40.

Ejemplos de cánceres del linaje de célula B que comprenden células neoplásicas que expresan CD40 son la leucemia linfoblástica aguda (ALL), la leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia prolinfocítica (PLL), leucemia de la célula del cabello, enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple, macroglobulinemia Waldenstrom, enfermedad de cadena pesada, y los linfomas, incluyendo, pero sin limitarse a linfoma linfocítico de pequeña difusión, folicular, DLBCL, linfoma de tejido linfoide asociado

con mucosal, linfoma de célula B monócitoide, linfoma esplénico, granulomatosis linfomatoide, linfomatosis intravascular, linfoma inmunoblástico, linfoma relacionado con el SIDA y similares.

Así, la composiciones farmacéuticas de la invención encuentran uso en el tratamiento de sujetos que tienen linfomas no Hodgkin relacionados con proliferación o acumulación anormal incontrolable de células B. para propósitos de la presente invención, tales linfomas serán llamados de acuerdo con el esquema de clasificación de formulación de trabajo, esto es aquellos linfomas de células B categorizados como de grado bajo, de grado intermedio y de alto grado (ver "The Non-Hodgkin's Linfoma Pathologic Classification Project," Cáncer 49(1982):2112-2135). Así, los linfomas de célula B de bajo grado incluyen células linfáticas pequeñas celular injertadas pequeñas foliculares y linfomas de células grandes e injertadas pequeñas mezcladas foliculares; linfomas grado intermedio incluyen las células grandes foliculares, las células injertadas pequeñas difusas, las células pequeñas y grandes mezcladas difusas, y linfomas de células grandes difusas. Y los linfomas de alto grado incluyen inmunoblásticos de células grandes, linfoblásticos, y linfomas de células no injertadas pequeñas del tipo Burkitt y no Burkitt'

Se reconocen que las composiciones farmacéuticas de la invención son útiles en el tratamiento terapéutico de linfomas de célula B que son clasificados de acuerdo con el sistema de clasificación de linfomas Europea y Americana revisado (REAL). Tales linfomas de células B incluyen pero no se limitan a,

linfomas clasificados como neoplasmos de célula precursora B, tales como la leucemia/linfoma linfoblástico B; los neoplasmos de célula B periférica, incluyendo la leucemia linfocítica crónica de célula B/linfoma linfocito pequeño, linfoma linfoplasmacitoide/inmunocitoma, linfoma de célula de la corteza (MCL), linfoma del centro del folículo (folicular) (que incluye célula pequeña difusa, célula pequeña y grande mezclada difusa, linfomas de células grandes difusa) linfoma de célula B de la zona marginal (incluyendo tipos extranodal, nodal, y esplénico), plasmacitoma/ mieloma, linfoma de célula B de célula grande difusa del subtipo primario mediastinal (química), linfoma de Burkitt, linfoma de célula B de alto grado similar a Burkitt; y linfomas de células B de bajo grado o de alto grado no clasificables.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden ser usadas para tratar sujetos que tienen condición premaligna conocida como MGUS (gamopatía monoclonal de significancia no determinada). Aproximadamente 25% de los pacientes con MGUS eventualmente desarrolla mieloma múltiple (MM) o un trastorno de células del plasma relacionados (Kyle (1993) Mayo Clinic. Proc. 68:26-36). La proliferación de células de plasma malignas en la medula del hueso, la detección de una proteína monoclonal en el suero o la orina (proteína M), anemia, hipercalcemia, insuficiencia renal, y lecciones de hueso líticas son manifestaciones clínicas de MM, mientras que el MGUS es reconocido clínicamente como la presencia de proteína M en el suero o la orina sin otros rasgos clínicos de MM (Ver, por ejemplo, Kyle and Lust (1989) Semin. Hematol 26: 176-200; Greipp

and Lust Stem Cells (1995) 13: 10-21). Los pacientes con MGUS son asintomático y tienen medidas estable de proteína M (Kyle (1993) Mayo Clinic. Proc. 68:26-36). Una vez que el MGUS es identificado en una terapia de mantenimiento del sujeto con una composición farmacéutica apropiada de la presente invención, por ejemplo, una composición que comprende un anticuerpo antagonista anti-CD40 descrito aquí, puede bloquear el desarrollo de mielomas múltiples en estos sujetos.

En particular, las composiciones farmacéuticas de la invención son útiles para tratar los linfomas de células B, incluyendo aquellos listados anteriormente, que son refractarios a (por ejemplo, resistentes a, o que se han vuelto resistentes a) tratamientos oncoterapéuticos de primera línea. El término "oncoterapéutico" tiene el propósito de significar un tratamiento para el cáncer tal como quimioterapia, cirugía, radiación, terapia, terapia de anticuerpos anti-cáncer, y combinaciones de éstos. Las subpoblaciones de los pacientes para quienes el tratamiento de intervención con uno o más anticuerpo anti-CD40 que modula la señalización CD40 mediada por CD40L, modula el ADCC, o ambos es deseable.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención son también útiles para el tratamiento de malignidad hematológica relacionadas con célula no B. tales malignidades incluyen, pero se limitan a leucemias agudas, leucemias mieloblástico; leucemias mielocíticas agudas; leucemia promielocíticas; leucemia mielomonocítica; leucemia monocítica; eritroleucemia; leucemia

granulocítica (leucemia mielocítica crónica); policitemia vera; y similares.

Los tumores sólidos que comprenden células neoplásicas que expresan CD40 y por lo tanto responde benéficamente al tratamiento con las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a ovarios, pulmón (por ejemplo cáncer de pulmón de células no pequeñas del carcinoma de células escamas, adenocarcinoma, y tipos de carcinoma de célula grande, y cánceres de pulmón de célula pequeña), pecho, colon, riñón (incluyendo, por ejemplo, carcinomas de la célula renal), vejiga, hígado (incluyendo, por ejemplo carcinomas hepatocelulares), gástrico, cervical, de próstata, nasofaringe, tiroides (por ejemplo, carcinoma papilar de tiroides), cánceres de la piel tal como melanoma, y sarcomas, incluyendo, por ejemplo, osteosarcomas y sarcomas Swing.

Los resultados benéficos que pueden lograrse mediante administrar una composición farmacéutica de la invención a un sujeto con un cáncer o una condición pre-maligna incluye cualquier respuesta terapéutica positiva con respecto a ese cáncer o condición. Por "respuesta terapéutica positiva" en el contexto del tratamiento del cáncer se quiere decir una mejora en la enfermedad en asociación con la actividad antineoplásica del agente terapéutico CD40 y/o una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad de interés. Esto es, un efecto anti-proliferativo, la prevención de crecimiento de tumores adicionales, una reducción en el tamaño del tumor, una reducción en el número de células cancerosa, y/o una disminución en uno o

más de los síntomas mediados por la estimulación de células que expresan CD40 puede ser observada. Así, por ejemplo, una respuesta terapéutica positiva podría referirse a uno o más de los siguientes mejoras en la enfermedad: (1) una reducción en el tamaño del tumor; (2) una reducción en el número de células de cáncer (por ejemplo, neoplásicas); (3) un incremento en la muerte de células neoplásicas; (4) la inhibición de la supervivencia de células neoplásicas; (4) inhibición (es decir, ralentización hasta algún grado, preferiblemente detención) del crecimiento del tumor; (5) inhibición (es decir, ralentización hasta algún grado, preferiblemente detención) de la infiltración de células de cáncer en órganos periféricos; (6) inhibición (es decir, ralentización hasta algún grado, preferiblemente detención) de metástasis de tumor; (7) la prevención de crecimiento de tumores adicionales; (8) una rata de supervivencia de pacientes incrementada; y (9) algún grado de alivio de uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. Las respuestas terapéuticas positivas en cualquier enfermedad maligna dada pueden ser determinadas por el criterio de respuesta estandarizada específica a esa enfermedad. La respuesta del tumor puede ser determinada por cambios en la morfología del tumor (es decir carga general del tumor, tamaño del tumor y similares) usando técnicas de tamización tales como barrido por creación de imágenes de resonancia magnética (MRI) creación de imágenes radiográficas de rayos X, barrido topográfico computarizado (CT), imágenes de barrido de huesos, endoscopia, y muestras de biopsia de tumores incluyendo aspiración de medula ósea (BMA) y cuenta de células tumorales en la circulación. En adición a estas respuestas terapéuticas positivas, el sujeto bajo terapia con la

composición farmacéutica que contiene el anticuerpo antagonista anti-CD40 de la invención puede experimentar el efecto benéfico de una mejora de los síntomas asociados con la enfermedad. Así para tumores de células B, el sujeto puede experimentar una disminución de los llamados síntomas B, es decir, sudoración nocturna, fiebre, pérdida de peso, y/o urticaria. Para condiciones pre-maligna, la terapia con el agente terapéutico anti-CD40 puede bloquear y/o prolongar el tiempo antes del desarrollo de una condición maligna relacionada, por ejemplo el desarrolla de mieloma múltiple en sujetos que sufren de gamopatía monoclonal de significancia indeterminada (MGUS).

Por "Actividad anti-inflamatoria" se quiere decir una reducción o prevención de la inflamación. La terapia con una composición farmacéutica líquida que contiene el anticuerpo antagonista anti-CD40 de la invención causa una respuesta fisiológica que es benéfica con respecto al tratamiento de una enfermedad autoinmune y/o enfermedad inflamatoria, en donde la enfermedad involucra células que expresan el antígeno CD40. Esto es reconocido que las composiciones de la invención pueden ser útiles en la prevención del cambio fenotípico en las células tales como proliferación, activación, y similares.

El sujeto que está siendo sometido a una intervención del tratamiento con una composición farmacéutica líquida que contiene el anticuerpo antagonista anti- CD40 de la invención puede estar afligido con o en riesgo de desarrollar o recaer con cualquier enfermedad inflamatoria o autoinmune que es mediada por la señalización CD40 sobre células que expresan el CD40. Las

enfermedades inflamatorias están caracterizadas por inflamación y destrucción del tejido, o una combinación de ellas. "enfermedad Inflamatoria " incluye cualquier proceso inflamatorio mediado inmune en donde el evento inicial u objetivo de la respuesta
5 inmune involucra antígenos no propios, incluyendo, por ejemplo, aloantígenos, xenoantígenos, antígenos virales, antígenos bacterianos, antígenos desconocidos, o alérgenos.

Adicionalmente, para propósitos de la presente invención, el
10 término " enfermedad o enfermedades inflamatoria" incluye "enfermedad o enfermedades autoinmune". Como se usa aquí, el término "autoinmunidad" generalmente se entiende que abarca los procesos mediados por inmunidad inflamatoria que involucra antígenos propios "las enfermedades autoinmunes, disparan los
15 antígenos propios en respuesta inmune anfitrionas.

También, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser usadas para el tratamiento de la inflamación asociada con rechazos de trasplante de tejidos. "Rechazo de
20 Trasplante" o "Rechazo de injerto" se refiere a cualquier respuesta inmune montada en el anfitrión contra un injerto que incluye pero no se limita a los antígenos HLA, los antígenos del grupo de sangre, y similares.

25 Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden ser usadas para el tratamiento de injertos contra enfermedades anfitrionas, tales como esas asociadas con trasplante de médula ósea, por ejemplo. En tales injertos contra enfermedades anfitrionas, la médula ósea donante incluye linfocitos y células

que maduran en linfocitos. Los linfocitos donantes reconocen los antígenos receptores como no propios y montan una respuesta inmune inflamatoria. Por lo tanto, como se usa aquí, "e injerto versus enfermedad anfitriona" o "injerto versus reacción anfitriona" se refiere a cualquier respuesta inmune mediada por células T en la cual los linfocitos donantes reaccionan con los antígenos del anfitrión.

Ejemplo de trastornos autoinmunes y/o inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, el lupus eritematoso sistémico (SLE), lupus discoide, lupus nefritis, sarcoidosis, artritis inflamatoria, incluyendo artritis juvenil, artritis reumatoide, artritis soriática, síndrome de Reiter, espondilitis anquilosante, y artritis gotosa, rechazo de un órgano o trasplante de tejido, rechazo hiperagudo, agudo o crónico y/o injerto versus enfermedad anfitriona, esclerosis múltiple, síndrome hiper IgE, poliarteritis nodosa, cirrosis biliar primaria, enfermedad de inflamación del intestino, enfermedad de Crohn, enfermedad del celíaco (enteropatía sensible al gluten), hepatitis autoinmune, anemia perniciosa, anemia hemolítica autoinmune, soriasis, escleroderma, miastenia gravis, púrpura trombocitopénica autoinmune, tiroiditis autoinmune, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad compleja inmune, síndrome de disfunción inmune de fatiga crónica (CFIDS), polimiositis y dermatomiositis, crioglobulinemia, trombosis, cardiomiopatía, pempigus vulgaris, fibrosis intersticial pulmonar, diabetes melitus tipo I y tipo II, hipersensibilidad tipo retardada 1, 2, 3, y 4, alergia o trastornos alérgico, respuestas inmunes no deseadas/ no intencionadas a proteínas

terapéutica (ver por ejemplo, las solicitud de patente U.S. No. US 2002/0119151 and Koren, et al. (2002) Curr. Pharm. Biotechnol. 3:349-60), asma, síndrome de Churg-Strauss (granulomatosis alérgica), dermatitis utópica, dermatitis alérgica y de contacto irritante, urticaria, alergia mediada por IgE, aterosclerosis, vasculitis, miopatías inflamatorias idiopática, enfermedad hemolítica, enfermedad de Alzheimer, polineuropatía demielinante inflamatoria crónica, y similares. En otras modalidades, las composiciones farmacéuticas de la presente invención son usadas para tratar individuos que tienen inflamación pulmonar, incluyendo, pero sin limitarse a rechazo de injerto en pulmones, asma, sarcoidosis, enfisema, fibrosis quística, fibrosis pulmonar idiopática, bronquitis crónica, rinitis alérgica y enfermedades alérgicas de los pulmones tales como la hipersensibilidad a la neumonitis, neumonía eosinófila, bronquiolitis obliterans debido a la medula ósea y/o trasplante de pulmón o otras causa, aterosclerosis de injerto/flebosclerosis de injerto, lo mismo que fibrosis pulmonar resultante de colágeno, enfermedades vasculares y autoinmunes tales como artritis reumatoide y lupus eritematoso.

En otras modalidades, las composiciones farmacéuticas de la presente invención son útiles para tratar enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias que son inicialmente resistentes a, o que desarrollan resistencia a otros tratamiento terapéuticos conocidos cuyo modo de acción es otro diferente mediante modulación de la señalización CD40 mediada por CD40L, modulación del ADCC, o ambas. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser usadas para tratar subpoblaciones de pacientes para quienes el tratamiento de intervención con uno o

más de los anticuerpos antagonistas anti-CD40 que modula la señalización CD40 mediada por CD40L, modula ADCC, o ambas es deseable.

Resultados benéficos que pueden ser logrados mediante administrar las composiciones farmacéuticas de la invención a un sujeto con una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmune incluye cualquier respuesta terapéutica positiva con respecto a esa enfermedad. Por "Respuesta terapéutica positiva" en el contexto de una enfermedad autoinmune y/o enfermedad inflamatoria se quiere decir una mejora en la enfermedad en asociación con la actividad anti-inflamatoria de estos anticuerpos o fragmentos que ligan al antígeno de los mismos, y/o una mejora de los síntomas asociados con la enfermedad. Esto es, un efecto anti-proliferativo, la prevención de proliferación adicional de las células que expresan CD40, una reducción en la respuesta inflamatoria que incluye pero no se limita a secreción reducida de citoquinas inflamatorias, moléculas de adhesión, proteasas, inmunoglobulinas (en casos en donde las células que llevan el CD40 es una célula B), combinaciones de las mismas, y similares, producción incrementada de proteínas anti-inflamatoria, una reducción en el número de células auto-reactiva, un incremento en la tolerancia inmune, inhibición de la supervivencia de células auto reactivas, y/o una disminución en uno o más de los síntomas mediados por la estimulación de células que expresan CD40 pueden observarse. Tales respuestas terapéuticas positivas no están limitadas a la ruta de administración y pueden comprender administración del donante, el

tejido donante (tal como por ejemplo perfusión de órganos), el anfitrión, o cualquier combinación de ellos, y similares.

La respuesta clínica puede ser determinada usando técnicas de tamizado o de selección tales como creación de imágenes por resonancia magnética (MRI), creación de imágenes radiográficas por rayos x, exploración tomografía computarizadas (CT), citometría de flujo o clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS), histología, patología gruesa, y química de sangre, incluyendo pero sin limitarse a cambios detectables por ELISA, RIA, cromatografías, y similares. En adición a estas respuestas terapéuticas positivas, el sujeto bajo terapia con una composición farmacéutica líquida que contiene el anticuerpo anti-CD40 antagonista de la invención puede experimentar el efecto genético de una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad.

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

20

EXPERIMENTAL

El CHIR-12.12 es un anticuerpo monoclonal anti-CD40 IgG₁ completamente humanizado producido por un proceso de cultivo de células CHO la molécula tiene un peso molecular de 150 kDa, y la estructura molecular consiste de dos cadenas pesadas y dos cadenas liviana ligadas juntas por enlaces disulfuro. El Los CHIR-12.12 le da a la proteína receptora de superficie celular de la célula CD40 humana. Esto es un antagonista fuerte e inhibe in

Vitro la proliferación medida por el ligando CD40 de célula B normales, lo mismo que inhibe in Vitro la proliferación mediada por el ligando CD40 de células de cáncer de pacientes NHL y CLL la línea de hibridoma 153.8E2.D10.D6.12.12 (CMCC# 12056) que expresa el anticuerpo CHIR-12.12 ha sido depositada con la colección de cultivos tipo americano [ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209 (USA)] en Septiembre 17, 2003, bajo el número de depósito de Patente PTA-5543.

Sin estar vincular por ninguna teoría, el anticuerpo CHIR-12.12 es un anticuerpo monoclonal antagonista anti-CD40 de doble acción que tiene una combinación única de atributos. Este anticuerpo monoclonal completamente humano bloquea los caminos de señalización CD40 mediados por CD40L para la supervivencia y proliferación de las células B; este antagonismo lleva en ultimo a la muerte celular. El CHIR-12.12 también media en el reconocimiento y ligado por células efectoras, que inician la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Una vez que el CHIR-12.12 está ligado a las células detectores, las enzimas citolíticas son liberadas, llevando a la apoptosis de las células B y la lisis.

Para una descripción más detallada de las actividades biológicas del CHIR-12.12, y los ensayos usados para medirlas, véase las solicitudes provisionales tituladas "Anticuerpos Antagonistas Monoclonales Anti-CD40 y Métodos para su Uso", presentada en Noviembre 4, 2003, Noviembre 26, 2003, y Abril 27, 2004, y cedidas a la solicitud de Patente U.S. Nos. 60/517,337 (Documento de abogado No. PP20107.001 (035784/258442)),

60/525,579 (Documento de abogado No. PP20107.002 (035784/271525)),
y 60/565,710 (Documento de abogado No. PP20107.003
(035784/277214)), respectivamente, y la Solicitud de patente
Internacional No. PCT/US2004/037152 (Documento de abogado No.
5 PP20107.004 (035784/282916)), también titulada "Anticuerpos
Antagonistas Monoclonales Anti-CD40 y Métodos para Uso"
presentada en Noviembre 4, 2004, y publicada como WO 2005/044854;
los contenidos de cada una de las cuales se incorpora aquí como
referencia en su totalidad. Ver también los ensayos descritos en
10 la solicitud provisional titulada "Métodos para el Diagnostico y
Tratamiento de Trastornos Proliferativos Mediados por la
señalización CD40", presentada en Diciembre 9, 2005, y cedida a
la solicitud de Patente U.S. No. 60/749,285 (Documento de abogado
No. PP028035.0002 (035784/304312)), y la solicitud de patente
15 Internacional No PCT/US2006/019414 (documento de abogado No
PP028035.0003 (035784/311611)), presentada en Mayo 18 del 2006, y
publicada como WO 2006/125143; y la solicitud provisional
titulada "Métodos para el Diagnostico y el Tratamiento de
Enfermedades que tienen un Componente autoinmune y/o
20 inflamatorio", presentada en Diciembre 9, 2005 y cedida a la
solicitud de patente U.S. 60/749,285 (documento de abogado No.
PP028035.0002 (035784/304312)), y la solicitud de Patente
Internacional correspondiente No PP028062.0003 (035784/311608)),
presentada en Mayo 18, 2006, y publicada como WO 2006/125117; el
25 contenido de cada una de ellas se incorpora aquí como referencia
en su totalidad.

Las aplicaciones clínicas principales del CHIR-12.12 son el
tratamiento de males relacionados con la célula B, incluyendo

leucemia linfocítica crónica (CLL), mieloma múltiple (MM), y linfoma no Hodgkin (NHL), y enfermedades autoinmunes y/o inflamatorias asociadas con las células que expresan el CD40. El producto fármaco CHIR-12.12 para ensayos clínicos es formulado en 20 mg/ml de anticuerpo CHIR-12.12 en una formulación líquida. Los siguientes estudios fueron tomados para determinar la amortiguación óptima, el agente isotonizante, y diversos excipientes para estabilizar el anticuerpo en la formulación líquida.

10

Ejemplo 1: Efectos de varias Especies Amortiguadoras y de al Metionina en la Estabilización del CHIR-12.12

Las condiciones de la solución (por ejemplo, pH, especies de amortiguador, y fuerza iónica) y excipientes (por ejemplo, tenso activos y estabilizadores) son factores críticos para estabilizar una proteína en una formulación líquida. La estabilidad físico química del CHIR-12.12 es óptima a un pH 5.5. Sin embargo, la proteína CHIR- 12.12 puede degradar por medio de la agregación y fragmentación bajo condiciones de solución no favorables; esta también se puede oxidar especialmente en la presencia de impurezas de peróxido y/o cantidades de trazas de metales introducidos con materiales excipientes en bruto tales como el Tween. Los siguientes experimentos fueron conducidos para identificar las mejores especies amortiguadoras y excipientes apropiados para estabilizar el anticuerpo monoclonal CHIR- 12.12 contra la agregación, fragmentación, oxidación cuando se formula en el pH óptimo 5.5.

Materiales

La sustancia fármaco CHIR-12-12 (DS) en lotes para el estudio fue purificada en masa de CHO y en el lote # CD021105A y el lote # PD010705A. Los lotes DS fueron producidos en Xoma, Ltd (Berkeley, CA). Las muestras de la formulación para este estudio fueron preparadas con diálisis del DS contra las soluciones amortiguadoras respectivas seguido por un rociado con la cantidad deseada de Tween. La concentración de la proteína CHIR- 12.12 en todas Las muestras fue de aproximadamente 20 mg/ml.

Métodos analíticos

Cromatografía por exclusión de tamaño (SEC).

El SEC-HPLC separa las moléculas en orden decreciente de peso molecular. Consecuentemente, los agregados CHIR- 12.12 son los primeros en eluir de la columna HPLC, seguido por el monómero, con los fragmentos eluyendo de último. La pureza, agregación, y fragmentación del CHIR- 12.12 fueron analizados por un HPLC Waters Alliance utilizando una columna Tosohaas TSK-GEL 3000SW_{xi}, 50 mM fosfato de sodio, 200 mM NaCl, pH 7.0 como fase móvil en una velocidad de flujo de 0.7 mL/min.

Cromatografía por interacción hidrófoba (HIC).

La oxidación del CHIR- 12.12 se mide utilizando un sistema HPLC Waters Alliance con una columna Tosoh TSK gel butil-NPR, 2 M sulfato de amonio/20 mM Tris, pH 7.0 como fase móvil A y 20 mM

Tris, pH 7.0 como fase móvil B en una velocidad de flujo de 1.0 ml/min. El anticuerpo CHIR-12.12 es digerido con papaína para producir fragmentos Fab y Fc. Los productos de oxidación del CHIR-12.12 son fragmentos Fc oxidados (metSO), que son especies pre-Fc que se eluyen entre las especies principales Fab y las especies principales Fc de la columna HPLC.

Experimentos y Resultados

10 *Efecto de estabilización del amortiguador de citrato sobre la agregación y la fragmentación*

El CHIR-12.12 del lote DS #PD010705A se formula a 20 mg/ml en 10 mM de citrato, acetato, succinato, o solución de amortiguador en fosfato con 150 mM NaCl, 0.1% (p/v) Tween 80 y pH 5.5. Las muestras de formulación se llenaron como soluciones de 1.2 ml en frascos de vidrio de 3 cc y almacenadas a 5°C, 25°C, y 40°C. Las muestras de estabilidad el CHIR-12.12 fueron analizadas en los puntos de tiempo designados por el ensayo SEC.

20

Las Figuras 1-3 muestran los análisis SEC en cuanto a pureza, agregados y fragmentos, respectivamente, en las muestras almacenadas a 4° C. Las figuras 4 a 6 resumen el análisis SEC en cuanto a pureza, agregados, y fragmentos, respectivamente, en las muestras almacenadas a 40° C. Todos los resultados muestran que las muestras con la formulación con base en citrato permanecieron en la más alta pureza y la más baja agregación y niveles de fragmentación entre las cuatro formulaciones ensayadas. Aunque hubo poco cambio detectado para las muestras almacenadas a 5 ° C

25

durante 5 meses (datos no mostrados), los datos SEC acelerados predijeron que el amortiguador de citrato era muy superior a las otras tres especies de amortiguador comúnmente utilizadas para mejorar la estabilidad a largo plazo en término real del CHIR 12.12 contra la agregación y la fragmentación-

Efecto de inhibición en oxidación del amortiguador de citrato en el CHIR-12.12.

10 Las muestras de estabilidad de CHIR- 12.12 se preparan en amortiguadores de citrato, acetato, y succinato con 0.1% y 0.2% (p/v) Tween 80. Las muestras se almacenan a 5° C, 25° C, y 40° C y analizadas mediante cromatografía por interacción hidrófoba (HIC) en cuanto a la oxidación en puntos de tiempo
15 predeterminados. Los productos de oxidación en el CHIR-12.12 fueron medidos como un porcentaje de sumas de las especies pico pre-Fc, es decir, pre-Fc %. Los resultados en la tabla 1 muestran que la formulación con base en citrato genera los productos con menor oxidación que las formulaciones amortiguadas con succinato
20 y acetato, indicando que el amortiguador de citrato minimiza la oxidación del CHIR- 12.12. Estos resultados sugieren que el ácido cítrico probablemente sirve como un agente quelante para inhibir la oxidación inducida por trazas de metal de la proteína CHIR-12.12. Los análisis SEC y HIC indican que el amortiguador de
25 citrato es similar a las especies amortiguadoras de succinato, acetato, y fosfato para proteger el CHIR-12.12 de la agregación y la fragmentación. El amortiguador de citrato también es superior a los amortiguadores de succinato o acetato ya que este minimiza la oxidación de la proteína CHIR-12.12.

Tabla 1. Efecto de especie de amortiguador sobre la oxidación de CHIR-12.12 (20 mg/ml) según se mide por ensayo HIC.

5	Formulación de Amortiguador con Tween 80		10 mM de Citrato 150 mM de NaCl pH 5.5	10 mM de Acetato 150 mM de NaCl pH 5.5	10 mM de Succinato 150 mM de NaCl pH 5.5
10	Concentración de Tween 80	Almacenamiento	Pre-Fc%	Pre-Fc%	Pre-Fc%
	0.1% (p/v)	5° C, 5 mo	0.0	0.0	0.0
		25° C, 5 mo	2.6	7.1	9.4
		40° C, 3 mo	5.6	N/D*	13.5
15	0.2% (p/v)	5° C, 5 mo	0.0	0.0	N/D
		5° C, 8 mo	2.0	2.0	2.2
		25° C, 5 mo	3.0	10.7	11.5
		25° C, 8 mo	4.8	18.1	19.4
		40° C, 3 mo	7.7	N/D	16.0

*N/D, no determinado.

20 Efecto de Inhibición sobre la Oxidación de L-Metionina en CHIR-
12.12

El DS lote #CD021105A se formula en 20 mg/ml en 10 mM de citrato de sodio/ácido cítrico, 150 mM de NaCl, 0.1% Tween 80 o Tween 20 así como también varias cantidades (0-5 mM) de L-
25 metionina. Se llenan frascos de 3 cc con muestras de la formulación en 2.5 ml y se almacena a 40° C. La Tabla 2 muestra los resultados HIC para las muestras en el tiempo inicial y a 40° C durante 3 meses. En el tiempo inicial, la oxidación de CHIR-12.12 en todas las formulaciones es comparable con la sustancia

de fármaco de volumen original (DS) lote # CD021105A. Los niveles de oxidación en las formulaciones sin L-metionina son más del doble luego de almacenamiento a 40° C durante 3 meses. Sin embargo, el nivel de oxidación en las formulaciones que contienen 5 L-metionina tienen poco cambio durante los 3 meses de almacenamiento a 40° C.

Los resultados indican que 5 mM de L-metionina es efectivo y suficiente para prevenir del CHIR-12.12 bajo condiciones de almacenamiento altamente tensas. El efecto de inhibición de la oxidación de L-metionina en CHIR-12.12 se confirma por el mapa de péptido Lyc.

Tabla 2. Efecto de inhibición de L-metionina sobre la oxidación de CHIR-12.12

Formulaciones con 20 mg/ml CHIR-12.12	Pre-Fc%	
	Tiempo 0	3 mos a 40° C
Volumen de CHIR-12.12 DS lote# CD 021105A	1.7	N/D*
10 mM de citrato de sodio/ácido cítrico, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-80, pH 5.5	1.6	4.2
10 mM de citrato de sodio/ácido cítrico, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-80, 2 mM de L-metionina, pH 5.5	1.6	1.6
10 mM de citrato de sodio/ácido cítrico, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH 5.5	1.7	3.9
10 mM de citrato de sodio/ácido cítrico, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, 2 mM de L-metionina, pH 5.5	1.5	1.1
10 mM de citrato de sodio/ácido cítrico, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, 5 mM de L-metionina, pH 5.5	1.5	1.2

*N/D, no determinado

En resumen, el amortiguador de citrato minimiza la agregación, fragmentación, y oxidación del CHIR-12.12, y por lo tanto representa un amortiguador óptimo para una formulación CHIR-12.12 líquida. La L-metionina inhibe efectivamente la oxidación del CHIR-12.12, con 5 mM de L-metionina que es el preferido.

Ejemplo 2: Efecto de Estabilización de Arginina-HCl sobre CHIR-12.12

El siguiente estudio está dirigido a la selección de un agente tonificante y estabilizador para estabilidad a largo plazo del CHIR-12.12 formulado como una composición farmacéutica líquida destinada a la administración por vía de infusión intravenosa. Aunque el NaCl es el agente de isotonización más comúnmente utilizado para productos parenterales de proteínas, éste puede no tener efectos estabilizantes óptimos sobre los terapéuticos de anticuerpos. Este estudio informa sobre los efectos de estabilización comparativa del cloruro de sodio y la forma ácida de arginina (arginina-HCl) sobre CHIR-12.12 en una formulación acuosa.

La sustancia de fármaco antidroga de volumen del CHIR-12.12 se formula con un amortiguador de citrato en pH 5.5, que emplea 150 mM de NaCl o 150 mM de L-arginina-HCl para lograr una osmolalidad objetivo de 295 mOsm/kg para la formulación líquida del CHIR-12.12. La Calorimetría de Exploración Diferencial (DSC), la cromatografía de exclusión de tamaño (SEC-HPLC), SDS-PAGE, y HPLC de Intercambio de Catión (CIEX-HPLC) se utilizan para

evaluar la estabilidad biofísica y/o bioquímica del anticuerpo CHIR-12.12. El estudio demuestra que 150 mM de L-arginina-HCl no sólo produce isotonicidad para una formulación acuosa de CHIR-12.12, sino también incrementa la estabilidad conformacional del CHIR-12.12 contra la agregación, fragmentación, y desamidación. La L-arginina-HCl probó ser superior al NaCl bajo condiciones de estabilidad acelerada. Adicionalmente, los datos de estabilidad acelerados predicen una mayor vida útil para la formulación L-arginina-HCl del CHIR-12.12.

Materiales

La sustancia fármaco (DS) del CHIR-12.12 utilizada para este estudio es un derivado CHO purificado en volumen lote # CD021105A. El lote DS se produce en Xoma Ltd. (Berkeley, CA).

El CHIR-12.12 del lote DS se utiliza en las siguientes formulaciones:

Formulación 1: 20 mg/ml CHIR-12.12, 10 mM de citrato de sodio/ácido cítrico, 150 mM de NaCl, 0.1% Tween 80, y pH 5.5.

Formulación 2: 20 mg/ml CHIR-12.12, 10 mM de citrato de sodio/ácido cítrico, 150 mM de L-arginina-HCl, 0.1% Tween 80, y pH 5.5.

Métodos Analíticos

Calorimetría de Exploración Diferencial (DSC)

La estabilidad conformacional de las muestras de formulación del CHIR-12.12 se evalúa utilizando un MicroCal VP-DESCRIPCIÓN
5 luego de calentar a 15° C a 90° C en 1° C/min.

Cromatografía de Exclusión de Tamaño (SEC-HPLC)

Se analiza la pureza, agregación, y fragmentación del CHIR-
10 12.12 mediante un Waters Alliance RPLC con una columna Tosohaas TSK-GEL 3000SW_{XL}, 50 mM de sodio, fosfato, 200 mM de NaCl, pH 7.0 como fase móvil en una velocidad de flujo de 0.7 ml/min.

SDS PAGE (Reducido y No Reducido)

15 También se evalúa la pureza del CHIR-12.12 utilizando 12% de geles Tris-Glicina bajo condiciones de reducción y no reducción. La proteína se detecta mediante teñido de azul Coomassie.

20 Cromatografía de Intercambio de Cation (CIEX-HPLC).

La desamidación relacionada con cambio de carga del CHIR-12.12 se mide utilizando un sistema HPLC Waters Alliance con una columna Dionex Propac WCX-10, 50 mM HEPES, pH 7.3 como fase móvil
25 A y 50 mM HEPES que contiene 500 mM de NaCl, pH 7.3 como la fase móvil B en un índice de flujo de 0.8 ml/min.

Lo siguiente es una clave las abreviaturas en las figuras en la sección de resultados de aquí en adelante:

Succinato, NaCl, 0.1% TW80 = 10 mM succinato de
sodio/amortiguador de ácido
succínico

5 150 mM NaCl, 0.1% Tween 80, pH 5.5

Citrato, NaCl, 0.1% Tw80 = 10 mM de amortiguador citrato de
sodio/ácido cítrico,

150 mM NaCl, 0.1% Tween 80, pH 5.5

Acetato, NaCl, 0.1 % Tw80 = 10 mM amortiguador de acetato de
sodio/ácido acético,

10 150 mM NaCl, 0.1% Tween 80, pH 5.5

Fos, NaCl, 0.1% Tw80 = 10 mM amortiguador de fosfato de
sodio dibásico/fosfato de sodio
monobásico, 150 mM NaCl, 0.1% Tween
15 80, pH 5.5

Citrato, Arg, 0.1 % Tw80 = 10 mM citrato de amortiguador de
sodio/ácido cítrico,

150 mM L-arginina-HCl, 0.1% Tween
20 80, pH 5.5

Resultados

Calorimetría de Exploración Diferencial (DSC).

25 La Figura 7 muestra teogramas DSC para CHIR-12.12 en las
dos formulaciones como se describe en la sección "Materiales"
anterior. El desdoblamiento térmico del CHIR-12.12 exhibe por lo
menos dos transiciones térmicas, probablemente representan el
desdoblamiento/fusión del Fab y los dominio Fc, respectivamente.

A mayores temperaturas, las proteínas presumiblemente agregadas, resultan en la pérdida de señal DSC. En este estudio, la más baja temperatura de transición térmica se define como la temperatura de fusión, T_m . La formulación que contiene L-arginina-HCl exhibe mayor T_m que la formulación que contiene NaCl, lo que sugiere que el L-arginina-HCl proporciona CHIR-12.12 con mayor estabilidad conformacional de lo que lo hace el NaCl.

Análisis SEC-HPLC

Después de incubación a 5° C durante 6 meses, el SEC-HPLC detecta cantidades insignificantes de agregados de proteína y fragmentos (<0.5%) en las formulaciones que contienen L-arginina-HCl y NaCl y no hay diferencia de estabilidad apreciable entre las dos formulaciones (datos no mostrados). Bajo condiciones de almacenamiento aceleradas, es decir, 25° C durante 6 meses, la formulación que contiene L-arginina-HCl contiene un mayor porcentaje de monómero, como se muestra en la Figura 8. A expensas del monómero, el contenido de agregado y fragmentos se reduce lentamente con el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, la formulación que contiene L-arginina-HCl genera menos agregados y fragmentos que la formulación que contiene NaCl como se muestra en las Figuras 9 y 10, respectivamente. De manera similar, cuando se almacena a 40° C, la formulación que contiene L-arginina-HCl exhibe un mayor porcentaje de monómero y menores porcentajes de agregados y fragmentos de lo que lo hace la formulación que contiene NaCl, como se muestra en la Figura 11, 12, y 13, respectivamente. Luego de almacenamiento a 40° C durante 4 meses, la formulación que contiene L-arginina-HCl tiene 91.8% de

monómero restante, 1.7% de agregados, y 6.5% de fragmentos, mientras que la formulación que contiene NaCl tiene 87.9% de monómero, 2.% de agregados, y 9.9% de fragmentos. Los resultados SEC-HPLC demuestran que la L-arginina-HCl mejora la estabilidad
5 de la proteína CHIR-12.12 en comparación con el NaCl.

SDS-PAGE (Reducido y No Reducido)

La Tabla 3 representa los resultados SDS-PAGE para las
10 formulaciones que contienen L-arginina-HCl y NaCl analizadas bajo condiciones no reducidas (NR) y reducidas (R). La pureza del CHIR-12.12 se mide como un porcentaje de la banda principal bajo condiciones no reducidas o como un porcentaje de la suma de las bandas de cadena liviana y pesada bajo condiciones reducidas.
15 Excepto en el tiempo 0, la formulación que contiene L-arginina-HCl muestra mayor pureza de lo que lo hace la formulación que contiene NaCl bajo ambas condiciones reducida y no reducida. La observación del SDS-PAGE es consistente con los resultados SEC-HPLC en que la L-arginina-HCl incrementa la estabilidad del CHIR-
20 12.12 sobre el NaCl.

Tabla 3. Comparación de L-arginina-HCl y NaCl por análisis SDS-PAGE.

Formulaci ón con 20 mg/ml CHIR- 12.12	T=0		4 mo a 25° C		4 mo a 40° C		6 mo a 25° C	
	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR
	%	%	%	%	%	%	%	%
	H+L	Princi pal	H+L	Princi pal	H+L	Princi pal	H+L	Princi pal
Citrato, NaCl, 0.1% Tween 80, pH 5.5	98.6	85.0	97.2	82.5	91.1	72.1	96.6	76.2
Citrato, L-arg- HCl, 0.1% Tween 80, pH 5.5	98.8	85.0	97.4	83.1	91.3	76.2	97.6	78.9

Análisis CIEX-HPLC

El CIEX-HPLC separa las moléculas basadas en la carga de tal manera que las variantes ácidas eluyen antes de las especies de pico principal y las variantes básicas eluyen después de las especies de pico principal. La pureza del CHIR-12.12 y su contenido de productos de desamidación se miden como porcentaje del pico principal y porcentaje de las variantes ácidas, respectivamente.

La Figura 14, 15 y 16, muestran la pureza, el contenido de producto de desamidación, y el contenido de las variantes básicas, respectivamente en las dos formulaciones. En el tiempo 0, las dos formulaciones tienen 68.6% de pureza y 15.5% de producto de desamidación, así como también 15.9% de variantes

básicas. Cuando se almacena a 25° C, la formulación que contiene L-arginina-HCl permanece en mayor pureza y en un mayor contenido de variantes básicas, y exhibe un menor porcentaje de productos de desamidación que la formulación que contiene NaCl. Luego de 5 almacenamiento a 25° C durante 6 meses, la formulación que contiene L-arginina-HCl tiene 47.3% de pureza, 12.5% de variantes básicas, y 40.0% de producto de desamidación generado, mientras que la formulación que contiene NaCl tiene 45.6% de pureza, 11.7% de variantes básicas, y 42.7% de producto de desamidación. Aunque 10 las formulaciones que contienen L-arginina-HCl y NaCl muestran poco cambio durante los 6 meses de almacenamiento a 5° C, los resultados del CIEX-HPLC bajo condiciones aceleradas de almacenamiento (25° C) predice que la L-arginina-HCl será probablemente superior al NaCl en la mejora de la estabilidad en 15 tiempo real a largo plazo de el CHIR-12.12 contra la desamidación.

En resumen, este estudio demuestra que 150 mM de L-arginina-HCl no sólo produce isotonicidad a la formulación 20 líquida CHIR-12.12, sino que también incrementa la estabilidad conformacional del CHIR-12.12 contra la agregación, fragmentación y desamidación. La L-arginina-HCl es superior al NaCl bajo condiciones de estabilidad aceleradas, y los datos de estabilidad acelerada predicen adicionalmente una vida de almacenamiento 25 mayor para la formulación L-arginina-HCl CHIR-12.12.

Ejemplo 3: Efectos del Tween 80 y Tween 20 en la Minimización de Agregación de Sustancias de Fármacos en Masa CHIR-12.12 de Almacenamiento Congelado

El almacenamiento congelado de la sustancia de fármaco en masa CHIR-12.12 se prefiere sobre el almacenamiento líquido por varias razones que incluyen estabilidad de producto incrementado y vida de almacenamiento, crecimiento microbiano reducido, así como también la eliminación del transporte durante formación de espuma. Sin embargo, el congelamiento y posterior descongelamiento pueden inducir tensión en la solución de proteína al introducir interfases de hielo-líquido y gradientes de concentración de solutos. Las tensiones pueden desnaturalizar las proteínas y conducir a la agregación y, en el peor de los casos, la formación de partículas visibles o precipitadas. Como los agregados de proteína se han asociado frecuentemente con la potencia reducida del fármaco y la inmunogenicidad incrementada, minimizar la agregación al optimizar los componentes de formulación de proteína y las condiciones de congelamiento-descongelamiento son muy críticas.

Los excipientes de formulación, tal como azúcares, alcoholes polihídricos, aminoácidos, y tensoactivos pueden posiblemente estabilizar proteínas y anticuerpos de la agregación. En un estudio de anticuerpo monoclonal, unos pocos azúcares comúnmente utilizados, alcoholes polihídricos, y aminoácidos se encuentra que son más efectivos que los tensoactivos en reducir la agregación activada por congelamiento-descongelamiento. Sin embargo, estudios anteriores con CHIR-12.12 muestran que el uso de un azúcar (por ejemplo, trehalosa), un alcohol polihídrico (por ejemplo, sorbitol), o un aminoácido (por ejemplo, glicina)

sola no puede reducir significativamente la agregación del CHIR-12.12 durante congelamiento y descongelamiento.

Este estudio se enfoca en los métodos de formulación para
5 minimizar la agregación del CHIR-12.132 durante el congelamiento y descongelamiento. De esta forma, se evalúan varios tensoactivos con el fin de minimizar la agregación inducida por congelamiento-descongelamiento del CHIR-12.12. Aunque no es probable que el congelamiento actual de la sustancia de fármaco CHIR-12.12
10 pudiera experimentar múltiples ciclos de congelamiento-descongelamiento según se evalúa en este estudio, los estudios de tensión de congelamiento-descongelamiento son evaluaciones del peor escenario utilizado para predecir el potencial para agregar el fármaco en masa formulado que debe ocurrir inadvertidamente
15 durante múltiple congelamiento y descongelamiento durante el almacenamiento a largo plazo y transporte.

Materiales

20 Los lotes de DS # UA7870, # TC23-2, # UB 1291, # PD010705A, y #CD083005A de CHIR-12.12 en volumen se utilizan para este estudio. El Tween 80, Tween 20, Brij 35, y Pluronic F68 se compra de Sigma, J.T. Baker, Alfa Aesar, y MediaTech Cellgro, respectivamente. La botella de policarbonato (PC) para
25 almacenamiento congelado de la sustancia de fármaco CHIR-12.12 se compra a Nalgene.

Métodos

Excepto para las muestras de control, todas las otras muestras se someten a congelamiento completo a -20°C o -60°C seguido por descongelamiento completo a temperatura ambiente durante múltiples ciclos.

Se emplean tres métodos analíticos para detectar la proteína CHIR-12.12 que varía de los monómeros a agregados visibles. Se desarrollan observaciones visuales bajo luz Tendal (M.W. Technologies, Inc.) para detectar partículas visibles. Se utiliza el Liquid Particle Counting System (HIAC/Royco) para contar los agregados subvisibles $\geq 10\text{ }\mu\text{m}$ y $\geq 25\text{ }\mu\text{m}$. Se emplea el Dynamic Light Scattering Analyzer (Malvern Nano Series) para determinar los diámetros hidrodinámicos de los monómeros y agregados y la distribución de tamaño de partícula.

Evaluación de Partículas Visibles

Las muestras para el estudio de congelamiento-descongelamiento se preparan de la sustancia de fármaco CHIR-12.12 lote #UA7870 y lote # TC23-2. Todas las muestras se formulan en 10 mM de citrato de sodio/ácido cítrico, 150 mM de NaCl, y solución de amortiguador pH 5.5 por diálisis, seguido por la adición de porcentajes variantes (0-0.5% p/v) de uno de los siguientes tensoactivos no iónicos: Tween 80, Tween 20, Brij 35, y Pluronic F68. Se llenan frascos con cada muestra de 2.5 ml y se someten a congelamiento durante la noche a -60°C y descongelamiento completo a temperatura ambiente durante hasta

ocho ciclos. Las muestras en el tiempo inicial (tiempo 0) y después de cada ciclo de congelamiento-descongelamiento se examinan visualmente para claridad y precipitados visibles/agregados.

5

Conteo de Partículas Sub-Visibles

La sustancia de fármaco CHIR-1.12 lote # UB 1291 y # PD010705A se formulan en la solución (20 mg/ml CHIR-12.12, 10 mM de citrato de sodio/ácido cítrico, 150 mM NaCl, en pH 5.5), seguido por la adición de 0-0.5% (p/v) de Tween 80 o Tween 20. Botellas de policarbonato de 125 cc se llenan con muestras de alícuotas de 20 ml de la formulación y se someten a congelamiento a -60° C y descongelamiento a temperatura ambiente. Después de cinco ciclos de congelamiento-descongelamiento, las muestras se miden para agregados sub-visibles $\geq 10 \mu\text{m}$ y $\geq 25 \mu\text{m}$ utilizando HIAC-Royco Liquid Particle Counting System.

20

Análisis de Dispersión de Luz Dinámica

Antes de y luego de 5 ciclos de congelamiento-descongelamiento, las formulaciones (20 mg/ml de CHIR-12.12, 10 mM de citrato de sodio/ácido cítrico, 150 mM de L-arginina-HCl, 5 mM de L-metionina, 0-0.2% Tween 20, y pH 5.5) se evalúan para agregados utilizando el Analizador de Dispersión de Luz Dinámica.

La espectroscopia de Dispersión de Luz Dinámica (DLS) calcula el diámetro hidrodinámico de las partículas que incluyen monómeros y agregados del coeficiente de difusión medido de las

partículas utilizando la ecuación Stokes-Einstein y se asume que el tamaño de las partículas es esférico. El número de especies agregadas y polidispersidad también se obtiene de los estudios DLS.

5

Resultados

Evaluación de Partículas Visibles

10 La Tabla 4 resume los resultados de la observación visual. En el tiempo 0, que es antes de iniciar los ciclos de congelamiento-descongelamiento, todas las muestras son ligeramente opalescentes sin agregados visibles/precipitados. Después de un ciclo de congelamiento-descongelamiento, unos pocos
15 agregados/precipitados visibles formados en todas las formulaciones sin ningún tensoactivo agregado, y en las formulaciones que contienen 0-0.5% (p/v) de Tween 80, y las formulaciones que contienen 0-0.1% (p/v) Brij 35 así como también en las muestras que contienen 0-0.5% (p/v) Pluronic F68. Las
20 muestras que contienen 0.05%-0.5% (p/v) Tween 20 no muestran ningún agregado o precipitados a través de los ocho ciclos de congelamiento-descongelamiento. Esto sugiere que el Tween 20 es más efectivo que el Tween 80 en prevenir la formación de grandes agregados insolubles de múltiples ciclos de congelamiento-
25 descongelamiento. El Brij 35 y el Pluronic F68 son muchos menos efectivos que el Tween 80 y el Tween 20.

Tabla 4. Apariencia Visual del CHIR-12.12 en las formulaciones de citrato amortiguado con concentraciones variantes de tensoactivo

Formulación de 20 mg/ml de CHIR-12.12 , 10 mM Citrato/Acido Cítrico, 150 mM NaCl, Tween 80, pH 5.5							
Concentración							
Tween 80 (p/v)	T=0	1XFT*	2XFT	4XFT	5XFT	6XFT	8XFT
0%	SO	SO, unos pocos ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt
0.05%	SO	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt
0.10%	SO	SO	SO	SO, unos pocos	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt
0.20%	SO	SO	SO	SO	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt
0.50%	SO	SO	SO	SO	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt
Formulación de 20 mg/ml de CHIR-12.12 , 10 mM Citrato/Ácido Cítrico, 150 mM NaCl, Tween 20, pH 5.5							
Concentración							
Tween 20 (p/v)	T=0	1XFT*	2XFT	4XFT	5XFT	6XFT	8XFT
0%	SO	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt
0.01%	SO	SO	SO	SO	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, ppt
0.05%	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO
0.10%	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO
0.20%	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO

0.50%	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO
Formulación de 20 mg/ml de CHIR-12.12 , 10 mM Citrato/Acido Cítrico, 150 mM NaCl, Brij 35, pH 5.5							
Concentración Brij 35 (p/v)	T=0	1XFT*	2XFT	4XFT	5XFT	6XFT	8XFT
0%	SO	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt
0.01%	SO	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt
0.10%	SO	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt
0.20%	SO	SO	SO	SO	SO	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt
0.50%	SO	SO	SO	SO	SO	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt
Formulación de 20 mg/ml de CHIR-12.12 , 10 mM Citrato/Acido Cítrico, 150 mM NaCl, Pluronic F68, pH 5.5							
Concentración Pluronic F68 (p/v)	T=0	1XFT*	2XFT	4XFT	5XFT	6XFT	8XFT
0%	SO	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt
0.01%	SO	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt
0.10%	SO	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt
0.20%	SO	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt
0.50%	SO	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt	SO, unos pocos ppt

Claves:XFT = no. ciclos de congelamiento-descongelamiento; SO = ligeramente opalescente; ppt = precipitado/agregado.

Conteo de Partículas Sub-Visibles

La Tabla 5 muestra los conteos de agregados sub-visibles por ml de formulaciones amortiguadas de citrato/ácido cítrico que contienen concentraciones variantes de Tween 80. Una tendencia hacia abajo en los conteos de partículas sub-visibles se observa cuando se incrementa la concentración de Tween 80; la reducción de los conteos de partículas sub-visibles es modesta cuando se observa Tween 80 por encima de 0.1% (p/v), lo que sugiere que la concentración apropiada para el uso del Tween 80 es 0.1-0.2% (p/v).

Tabla 5. Conteos de partículas sub-visibles en las formulaciones que contienen 20 mg/ml de CHIR-12.12, 10 mM de citrato de sodio/ácido cítrico, 150 mM NaCl y concentraciones variantes (0-0.2% p/v) de Tween 80 en pH 5.5.

Concentración de Tween 80 (p/v)	Conteos de Partículas Sub-Visibles/ml después de 5 Ciclos de Congelamiento-Descongelamiento	
	≥ 10 μm	≥ 25 μm
0% Tween 80	1439	23
0.05% Tween 80	148	3
0.10% Tween 80	44	1
0.20% Tween 80	39	1

La Tabla 6 muestra conteos de agregados sub-visibles por ml de formulaciones amortiguadas de citrato/ácido cítrico con o sin Tween 20. Los conteos de agregados se reducen grandemente con la adición de Tween 20 en la formulación. Cuando el Tween 20 es de

0.05% (p/v) y superior, la reducción en los conteos de agregados sub-visibles casi alcanza una meseta, lo que sugiere que la concentración apropiada del Tween 20 es aproximadamente 0.05-0.2% (p/v).

5

Tabla 6. Conteos de partículas sub-visibles en las formulaciones que contienen en 20 mg/ml de CHIR-12.12, 10 mM de citrato de sodio/ácido cítrico, 150 mM NaCl, y concentraciones variantes (0-0.2% p/v) de Tween 20 en pH 5.5.

10

Concentración de Tween 20 (p/v)	Conteos de Partículas Sub-Visibles/ml después de 5 Ciclos de Congelamiento-Descongelamiento	
	≥ 10 μm	≥ 10 μm
0% Tween 20	1671	41
0.01% Tween 20	46	2
0.05% Tween 20	32	3
0.10% Tween 20	11	1
0.20% Tween 20	25	1

15

20

Adicionalmente, las Tablas 5 y 6 muestran que las formulaciones que contienen Tween 80 y Tween 20 generan muy pocos agregados ≥ 25 μm, y la formulación que contiene Tween 20 genera menores agregados ≥ 10 μm de lo que lo hacen las formulaciones que contienen Tween 80 después de 5 ciclos de congelamiento-descongelamiento. Los resultados indican que el Tween 20 es más efectivo que el Tween 80 en minimizar la formación de agregados

25

sub-visibles en la formulación amortiguada de citrato/ácido cítrico CHIR-12.12.

Basados en los resultados en las Tablas 4, 5, y 6, el Tween 20 representa un excipiente preferido sobre el Tween 80 para minimizar la formación de agregados en las formulaciones CHIR-12.12. De acuerdo con lo anterior, se conducen estudios adicionales para optimizar adicionalmente las concentraciones de Tween-20 necesarias para obviar la formación de agregados en las formulaciones CHIR-12.12. Las formulaciones (20 mg/ml CHIR-12.12, 10 mM de citrato de sodio/ácido cítrico, 150 mM de L-arginina-HCl, 0-0.2% Tween 20, en pH 5.5) se preparan de la sustancia de fármaco CHIR-12.12 lote # CD83005A. Se llenan botellas de policarbonato de 125 cc con muestras de 20 ml de la formulación y se someten a congelamiento a -20° C y descongelamiento a temperatura ambiente. Antes de y luego de 5 ciclos de congelamiento-descongelamiento, las muestras de formulación se miden para conteos de partículas sub-visibles utilizando un contador de partículas líquido HIAC-Royco. Los resultados se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Conteos de partículas sub-visibles en las formulaciones que contienen 20 mg/ml de CHIR-12.12, 10 Mm de citrato de sodio/ácido cítrico, 150 mM de L-arginina-HCl, 5 mM de L-metionina, 0-0.2% Tween 20, en pH 5.5.

5

10

Concentración de Tween 20 (p/v)	Conteos de Partículas/ml ≥ 10 μm		Conteos de Partículas/ml ≥ 25 μm	
	Antes de FT	Post 5XFT	Antes de FT	Post 5XFT
0% Tween 20	23	169	7	5
0.005% Tween 20	4	24	0	2
0.025% Tween 20	5	6	1	1
0.05% Tween 20	2	9	0	1
0.1% Tween 20	6	7	1	1
0.2% Tween 20	10	64	1	5

15

*Clave: XFT = no. de ciclos de congelamiento-descongelamiento.

20

25

Después de cinco ciclos de congelamiento-descongelamiento, las muestras se contienen L-arginina-HCl y L-metionina generan muchos menos agregados que la formulación sin L-arginina-HCl y L-metionina, es decir, 169 partículas/ml $\geq 10 \mu\text{m}$ versus 1439 o 1671 partículas/ml $\geq 10 \mu\text{m}$ en la ausencia de Tween 20 (ver Tablas 6 y 7). Sin embargo, hasta que se introduce el Tween 20, la L-arginina-HCl y L-metionina no reducen significativamente los agregados inducidos por congelamiento-descongelamiento a un nivel mínimo. Esto sugiere que la L-arginina-HCl y L-metionina no son suficientemente efectivas en minimizar la agregación inducida por el congelamiento-descongelamiento del CHIR-12.12.

De los datos resumidos en la Tablas 5-7, los conteos de agregados sub-visibles de las muestras de congelamiento-descongelamiento que contienen 0.025-0.1% (p/v) Tween 20 permanecen comparables con las muestras respectivas antes del ciclo de congelamiento-descongelamiento. Esto indica que las formulaciones que contienen Tween 20 en combinación con L-arginina-HCl y L-metionina generan agregados sub-visibles mínimos. Así, el Tween 20 es el excipiente en la formulación que minimiza efectivamente el CHIR-12.12 de generar agregados sub-visibles durante el congelamiento y descongelamiento. La concentración efectiva de Tween 20 se determina que es 0.025-0.1% (p/v).

15 *Análisis de Dispersión de Luz Dinámica*

La Tabla 8 muestra el diámetro hidrodinámico medio de las partículas, polidispersidad, y porcentaje de intensidad de las especies de monómero del CHIR-12.12. El análisis de dispersión de luz dinámica detecta sólo especies de monómero en todas las muestras antes de y post cinco ciclos de congelamiento-descongelamiento, como se muestra por el 100% de intensidad de las especies de monómero. Esto sugiere que todas las muestras están compuestas principalmente de monómeros. Después de cinco ciclos de estudios de congelamiento-descongelamiento, unos pocos agregados (posiblemente dímeros o trímeros) pueden coexistir con el monómero en las muestras sin Tween 20 y con 0.005% (p/v) Tween 20, como se muestra por el incremento del diámetro hidrodinámico y la polidispersidad. Las muestras que contiene 0.025%-0.1% (p/v)

Tween 20 muestran poco cambio en el diámetro hidrodinámico en los valores de polidispersidad, lo que indica que ellas permanecen en los niveles previos de los monómeros sin formación apreciable de agregados.

5

Tabla 8. Análisis de Dispersión de Luz Dinámica de CHIR-12.12 antes y después de cinco ciclos de congelamiento-descongelamiento de la formulación que contiene 20 mg/ml de CHIR-12.12, 10 mM de citrato de sodio/ácido cítrico, 150 mM de L-arginina-HCl, 5mM L-metionina, y concentraciones variantes (0-0.2%) de Tween 20, en pH 5.5.

10

15

20

25

Concentración de Tween 20 (p/v)	Diámetro Hidrodinámico Medio (nm)		Polidispersidad		% de Intensidad de Especies de Monómero	
	Antes de FT	Post 5XFT	Antes de FT	Post 5XFT	Antes de FT	Post 5XFT
0% Tween 20	12.2	12.4	0.047	0.055	100.0	100.0
0.005% Tween 20	12.2	12.4	0.045	0.045	100.0	100.0
0.025% Tween 20	12.3	12.4	0.035	0.034	100.0	100.0
0.05% Tween 20	12.3	12.2	0.035	0.031	100.0	100.0
0.1% Tween 20	12.4	12.4	0.035	0.039	100.0	100.0
0.2% Tween 20	12.4	12.2	0.036	0.043	100.0	100.0

*Clave: FT = congelamiento-descongelamiento, XFT = no. de ciclos de congelamiento-descongelamiento.

Basado en la observación visual, los conteos de partículas sub-visibles, y el análisis de Dispersión Dinámico de Luz, la concentración óptima de Tween 20 se determina que es 0.025-0.1% (p/v) para minimizar el CHIR-12.12 de la agregación inducida por congelamiento-descongelamiento.

En resumen, se ha encontrado que el Tween 20 y Tween 80 minimiza la agregación del CHIR-12.12 durante el congelamiento y descongelamiento. Las concentraciones óptimas del Tween 20 y Tween 80 son 0.025-0.1% (p/v) y 0.1-0.2 (p/v)%, respectivamente. El Tween 20 es más efectivo que el Tween 80 ya que una menor concentración de Tween 20 reduce el número y alcance de la formación de agregados a un menor nivel. Este estudio ha demostrado que la adición de una concentración óptima de Tween, preferiblemente en combinación con L-arginina-HCl y L-metionina, permite el almacenamiento de la sustancia medicinal de volumen CHIR-12.12 amortiguada con citrato/ácido cítrico a -20° C o por debajo sin agregación significativa.

Ejemplo 4: Ensayo para Actividad Antagonista de Anticuerpos de Anti-CD40

Se pueden utilizar los siguientes ensayos para evaluar la actividad antagonista de un anticuerpo anti-CD40. Las células B humanas para estos ensayos se pueden obtener, por ejemplo, por aislamiento de amígdalas obtenidas de individuos que sufren de amigdalectomías, esencialmente como se describe en De Groot et al. (1990) *Lymphokine Research* (1990) 9:321. En resumen, el tejido se dispersa con cuchillas de bisturí, las células

fagocíticas y NK se agotan mediante tratamiento con 5 mM de metiléster de L-leucina y las células T se remueven mediante un ciclo de roseta con eritrocitos de oveja (SRBC) tratados con bromuro de 2-aminoetil isotiouronio. La pureza de las preparaciones del linfocito B resultante se pueden revisar mediante etiquetado inmunofluorescente con anti-(CD20) mAb B1 (Coulter Clone, Hialeah, FA) o anti-(CD3) mAb OKT3 (Ortho, Raritan, NJ) y un fragmento FITC-conjugado F(ab')₂ de anti-(ratón Ig) (Zymed, San Francisco, CA), y análisis FACS.

10

Ensayo de Proliferación de Células B

Se cultivan células B (4×10^4 por pozo) en 200 μ l IMDM complementado con 10% de suero de becerro fetal en placas de microtítulo de 96 pozos de fondo plano. Las células B se estimulan por la adición de anticuerpos anti-(IgM) inmovilizados (Immunobeads; 5 μ g/ml; BioRad, Richmond, California). Cuando se desee, se agrega 100 U/ml de IL-2 recombinante. Si las concentraciones variantes de anticuerpos monoclonales de prueba (mAbs) se agregan al inicio de los microcultivos y se evalúa la proliferación en el día 3 mediante medición de la incorporación de (³H)-timidina después de 18 horas de pulsación.

Un anticuerpos anti-CD40 antagonista no coestimula significativamente la proliferación de células B humanas en la presencia de anti-IgM inmovilizado o en la presencia de anti-IgM inmovilizado e IL-2.

25

Ensayo de Proliferación de Células B Similares a Banphereau

Para evaluar la capacidad de los anticuerpos monoclonales anti-CD40 para estimular la proliferación de células B en un sistema de cultivo análogo a aquel descrito por Banphereau et al. (1991) *Science* (1991) 251:70, se utilizan las células transfectantes 3T6 de ratón que expresan la forma alélica HR de FcγRII. Las células B (2×10^4 por pozo) se cultivan en micropozos de fondo plano en la presencia de 1×10^4 células transfectantes (irradiadas con 5000 Rad) en 200 μl de IMDM complementado con 10% de suero de becerro fetal y 100U/ml de IL-4 recombinante. Antes de la adición de las células B, las células 3T6 se les permite adherirse al plástico de cultivo durante por lo menos 5 horas. El mAb anti-CD40 se agrega en concentraciones que varían de 15 mg/ml a 2000 ng/ml y se evalúa la proliferación de células B mediante medición de la incorporación de timidina en el día 7, luego de 18 horas de pulsación con timidina [^3H].

Inhibición de Proliferación de Células B Estimuladas con S2C6

Utilizando Antagonista mAb Anti-CD40.

Los anticuerpos antagonistas anti-CD40 monoclonales (mAb) también se pueden caracterizar por su capacidad para inhibir la estimulación de la proliferación de células B mediante un anticuerpo anti-CD40 tal como S2C6 (también conocido como SGN-14 que se reporta como agonista de la estimulación CD40 de proliferación de células B normales; Francisco et al. (2000) *Cancer Res.* 60:3225-3231) utilizando el Ensayo de Proliferación de Células B descrito anteriormente. Las células B de amígdalas

humanas (4×10^4 por pozo) se cultivan en 200 μ l en micropozos en la presencia de anti-IgM acoplado a glóbulos de Sefarosa (5 μ g/ml) y anti-CD40 mAb S2C6 (1.25 μ g/ml). Concentraciones variantes de anti-CD40 mAb de interés se agregan y se evalúa la
5 incorporación de [^{3} H]-timidina después de 3 días. Como un control anti-(glucurocerebrosidasa) mAb 8E4 se puede agregar en concentraciones similares. Barneveld et al. (1983) *Eur. J. Biochem.* 134:585. Un antagonista de anticuerpo anti-CD40 puede inhibir la coestimulación del anti-IgM inducida por proliferación
10 de células B humanas por mAb S2C6, por ejemplo, mediante por lo menos 75% o mas (es decir, proliferación S2C6 estimulada en la presencia de un antagonista de anticuerpo anti-CD40 que no es mayor del 25% de aquel observado en la ausencia del antagonista de anticuerpo anti-CD40). En contraste, no se observaría
15 inhibición significativa con cantidades equivalentes de mAb 8E4 no relevante, dirigida a β -glucocerebrosidasa. Barneveld et al., *supra*. Tal un resultado indicaría que el anti-CD40 mAbs no suministra señales estimuladoras para la proliferación de células B humanas, pero, por el contrario, puede inhibir las señales
20 estimuladoras ejercidas al accionar el CD40 con mAb.

Ensayo de Activación de Células B con células EL4B5.

Zublet et al. (1985) *J. Immunol.* (1985) 134:3662 observo que
25 un subclon mutante de la línea EL-4 de timoma de ratón, conocido como EL4B5, puede estimular fuertemente las células B de origen humano en murino para proliferar y diferenciar dentro de las células de plasma que secretan inmunoglobulina *in vitro*. Esta

activación se encuentra que es independiente de antígeno y no de MHC restringido. Para estimulación óptima de las células B humanas, la presencia del sobrenadante de las células T humanas activas es necesaria pero también ocurre una respuesta de células B cuando las células EL4B5 se preactivan con forbol-12-miristato 13-acetato (PMA) o IL-1. Zubler et al. (1987) *Immunological Reviews* 99:281; y Zhang et al. (1990) *J. Immunol.* 144:2955. La activación de células B en éste sistema de cultivo es eficiente - los experimentos de dilución limitados han mostrado que la mayoría de células B humanas se pueden activar para proliferar y diferenciar dentro de las células que secretan anticuerpo. Wen et al. (1987) *Eur. J. Immunol.* 17:887.

Las células B (1000 por pozo) se cultivan junto con células EL4B5 irradiadas (5000 Rad) (5×10^4 por pozo) en placas de microtítulo de fondo plano en 200 μ l de IMDM complementado con 10% de suero de becerro fetal inactivado por calor, 5 ng/ml de forbol-12- miristato 13-acetato (Sigma) y 5% de sobrenadante de células T humanas. Se agrega mAbs en concentraciones variantes en el inicio de los cultivos y la incorporación de timidina se evalúa en el día 6 después de 18 horas de pulsación con [3H]-timidina. Para la preparación del sobrenadante de células T, se cultivan células T purificadas en una densidad de 10^6 /ml durante 36 horas en la presencia de 1 μ g/ml PHA y 10 ng/ml PMA. Wen et al. (1987) *Eur. J. Immunol.* (1987) 17:887. Se obtiene el sobrenadante de células T por centrifugación se las células y se almacena a -20 °C. La efectividad de los sobrenadantes de célula T en mejorar la proliferación de las células B humanas en cultivos de células EL4B5-B se prueba y la mayoría de sobrenadantes efectivos se

agrupa para uso en los experimentos. Cuy o se evalúa el efecto de un anticuerpo anti-CD40 sobre la proliferación de células B humanas EL4B5 inducidas, un anticuerpo monoclonal tal como MOPC-141 (IgG2b) se puede agregar como un control.

5

Un antagonista de anticuerpo anti-CD40 puede inhibir la proliferación de células B estimuladas por línea celular EL4B5, por ejemplo, mediante por lo menos 75% o más (es decir, proliferación de células B inducidas por EL4B5 en la presencia de un antagonista de anticuerpo anti-CD40 que no es mayor del 25% de aquel observado en la ausencia del anticuerpo anti-CD40 antagonista). En contraste, un anticuerpo de control tal como MOPC- 141 no tendría efecto significativo sobre la proliferación de células B inducidas por EL4B5.

15

Ensayo auxiliar de células T humanas para producción de anticuerpo por células B

Un antagonista de anticuerpo anti-CD40 puede funcionar como un antagonista de la producción de inmunoglobulina por las células B. Se puede probar un anticuerpo anti-CD40 para este tipo de actividad antagonista al evaluar la capacidad del anticuerpo para inhibir la producción de inmunoglobulina por las células B que se han estimulado en una forma dependiente del contacto con células T activas en un ensayo auxiliar de células T. De esta forma, las placas de cultivo de tejido de 96 pozos se cubren con una dilución de 1:500 de fluido de ascitos de anti-CD3 mAb CLB-T3/3 (CLB, Amsterdam, Holy a). Como coestimulador indicado se agrega mAb: anti CD2 mAb CLB-TI 1.1/1 y CLB-T1 1.2/1 (CLB,

Amsterdam, Holy a), ascitos 1: 1000 y anti-CD28 mAb CLB-28/1 (CLB, Amsterdam, Holy a). Posteriormente, se agregan las células T de amígdalas (irradiadas, 3000 Rad; 105 por pozo), células B de amígdala (104 por pozo), y rIL-2 (20 U/ml). El volumen final de cada cultivo celular es 200 µl. Después de ocho días, las células se centrifugan, y se cosecha el sobrenadante libre de células. La concentración del IgM e IgG en las muestras (diluidas) se estima por ELISA como se describió anteriormente.

10 En una modalidad, las células B de amígdala humana (10^4 /pozo) se cultivan con células T purificadas irradiadas (3000 rad, 105 /pozo) en placas de 96 pozos, se cubre con anti-CD3 mAb y con y sin diferentes mAb para coestimular las células T. Después de ocho días de cultivo se cosechan los sobrenadantes
15 para la determinación de la producción de inmunoglobulina por las células B. La producción de inmunoglobulina por las células B se evalúa mediante el ensayo ELISA descrito anteriormente. El anticuerpo anti-CD40 de interés se agrega en concentraciones variantes del inicio de los cultivos. Como un control, se puede
20 agregar mAb MOPC- 141.

Un antagonista de anticuerpo anti-CD40 puede inhibir la producción de anticuerpo IgG e IgM de células B estimuladas por células T humanas de por lo menos 50% o más (es decir, producción
25 de anticuerpo inducido mediante células T por células B en la presencia de un anticuerpo anti-CD40 antagonista que no es mayor del 50% de aquel observado en la ausencia del anticuerpo anti-CD40 antagonista). En contraste, un anticuerpo de control tal como MOPC- 141 no tendría efecto significativo sobre la

producción de anticuerpo inducido por células T mediante células B.

Ensayo ELISA para cuantificación de inmunoglobulina

5

Las concentraciones de IgM e IgG humanas se estiman por ELISA. Las placas ELISA de 96 pozos se cubre con 4 µg/ml de IgG anti -humano de ratón mAb MH 16-01 (CLB, Amsterdam, Holy a) o con 1.2 µg/ml IgM anti-humano mAb 4102 (T ago, Burlingame, CA) en 10 0.05 M de amortiguador de carbonato (pH = 9.6), mediante incubación durante 16 h 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 lavados las placas se incuban durante 1 h a 37° C con diferentes diluciones de las muestras de prueba. 15 Después de tres lavados, el Ig unido se detecta por incubación durante 1 h a 37° C con 1 µg/ml de IgG mAb antihumano de ratón etiquetado con peroxidasa MH 16-01 (CLB) o IgM mAb antihumano de ratón MH 15-01 (CLB). Las placas se lavan 4 veces y la actividad de peroxidasa unida se revela por la adición de O- 20 fenilenodiamina como un sustrato. El suero estándar humano (HOO, CLB) se utiliza para establecer una curva estándar para cada ensayo.

El artículo "un" y "uno" se utiliza aquí para referirse a 25 uno o más de (es decir por lo menos uno) el objeto gramatical del artículo. Por vía de ejemplo, "un elemento" significa uno o más elementos.

00256

Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas de la especificación son indicadoras del nivel de experticio en la técnica a la que pertenece la invención. Todas las publicaciones y solicitudes de patente se incorporan aquí como
5 referencia para el mismo alcance como si cada publicación inicial o solicitud de patente se indicara específica e individualmente para ser incorporada como referencia.

Aunque la anterior invención se ha descrito en algún detalle
10 por vía de ilustración y ejemplo para propósito de claridad y entendimiento, será obvio que ciertos cambios y modificaciones se pueden practicar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

00057

Archivo de referencia del agente o solicitante	PP028228.0002 (325023)	Solicitud internacional No.	PCT/US2007/
--	------------------------	-----------------------------	-------------

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 40, línea 5	
B. IDENTIFICACIÓN DE DEPÓSITO	Se identifican depósitos adicionales en
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
Página 40, línea 5; página 41, línea 2	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS CUALES SE HACEN INDICACIONES (si los indicadores no son para todos los Estados designados)	
E. PRESENTACIÓN POR SEPARADO DE LAS INDICACIONES (dejar en blanco si no aplica)	
Las indicaciones listadas adelante se presentarán a la Oficina Internacional después (especifique la naturaleza general de las indicaciones por ejemplo, "Número de Acceso de Depósito"	

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

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

Archivo de referencia del agente o solicitante	PP028228.0002 (325023)	Solicitud internacional No.	PCT/US2007/
---	------------------------	-----------------------------------	-------------

**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
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 40, línea 5; página 41, línea 2; página 67, línea 17	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS CUALES SE HACEN INDICACIONES (si los indicadores no son para todos los Estados designados)	
E. PRESENTACIÓN POR SEPARADO DE LAS INDICACIONES (dejar en blanco si no aplica)	
Las indicaciones listadas adelante se presentarán a la Oficina Internacional después (especifique la naturaleza general de las indicaciones por ejemplo, "Número de Acceso de Depósito")	

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

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

ATCC

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

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

FORMA INTERNACIONAL

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

A: (Nombre y dirección del Depositante o Abogado)

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

Depositado en nombre de: Chiron Corporation

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(Aparece firma ilegible)

Fecha Octubre 2, 2003

María Harris, Especialista en Patentes, Depositario de Patentes ATCC
cc: Lisa Alexy er
Ref: Registro o Caso No: P20107.001

REIVINDICACIONES

LO QUE SE REIVINDICA ES:

5 1. Una composición farmacéutica líquida estable que comprende:

a) un anticuerpo monoclonal anti-CD40 antagonista como un
componente terapéuticamente o profilácticamente activo, en
donde dicho anticuerpo monoclonal es capaz de unirse
10 específicamente a un antígeno CD40 de humano expresado sobre
la superficie de de una célula B humana, dicho anticuerpo
monoclonal está libre de actividad agonista significativa
cuy o se une al antígeno CD40 expresado sobre la superficie
de dicha célula B;

15 b) una cantidad de arginina en su forma ácida (arginina-HCl)
suficiente para hacer que dicha composición sea casi
isotónica; y

20 c) un agente de amortiguación para mantener el pH de dicha
composición dentro de un rango de aproximadamente pH 5.0 a
aproximadamente pH 7.0, en donde dicho agente de
amortiguación es un amortiguador de citrato/ácido cítrico.

25 2. La composición de la reivindicación 1, en donde dicha
composición tiene una osmolalidad de aproximadamente 240
mmol/kg a aproximadamente 360 mmol/kg.

3. La composición de la reivindicación 1, en donde la concentración de dicho agente de amortiguación es de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM.
- 5 4. La composición de la reivindicación 3, en donde la concentración de dicho agente de amortiguación es de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM.
- 10 5. La composición de la reivindicación 4, en donde la concentración de dicho agente de amortiguación es de aproximadamente 10 mM.
- 15 6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho agente de amortiguación es un amortiguador de citrato de sodio/ácido cítrico.
7. La composición de la reivindicación 6, en donde dicha composición tiene un pH de aproximadamente pH 5.5.
- 20 8. La composición de la reivindicación 1, en donde dicha composición comprende arginina-HCl en una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM.
- 25 9. La composición de la reivindicación 8, en donde dicha composición comprende arginina-HCl en una concentración de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 175 mM.

10. La composición de la reivindicación 9, en donde dicha composición comprende arginina-HCl en una concentración de aproximadamente 150 mM.
- 5 11. La composición de la reivindicación 8, en donde la concentración de dicho agente de amortiguación es de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM.
- 10 12. La composición de la reivindicación 11, en donde dicho agente de amortiguación es un amortiguador de citrato de sodio/ácido cítrico, y en donde la concentración de dicho agente de amortiguación es de aproximadamente 10 mM, y dicha composición has a pH de aproximadamente pH 5.5.
- 15 13. La composición de la reivindicación 12, en donde dicha composición comprende arginina-HCl en una concentración de aproximadamente 150 mM.
- 20 14. La composición de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un tensoactivo.
15. La composición de la reivindicación 14, en donde dicho tensoactivo es polisorbato 20.
- 25 16. La composición de la reivindicación 15, en donde dicho tensoactivo es polisorbato 20 en una concentración de aproximadamente 0.001% a aproximadamente 1.0% (p/v).

17. La composición de la reivindicación 16, en donde dicha composición comprende polisorbato 20 en una concentración de aproximadamente 0.025% a aproximadamente 0.1% (p/v).

5 18. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 14, que comprende adicionalmente metionina en una cantidad suficiente para inhibir la oxidación de por lo menos un residuo de aminoácido oxidable en dicho anticuerpo monoclonal anti-CD40 durante almacenamiento de dicha
10 composición.

19. La composición de la reivindicación 18, en donde dicha composición comprende metionina en una concentración de aproximadamente 0.5 mM a aproximadamente 20.0 mM.

15 20. La composición de la reivindicación 19, en donde dicha composición comprende metionina en una concentración de aproximadamente 1.0 mM a aproximadamente 20.0 mM.

20 21. La composición de la reivindicación 20, en donde dicha composición comprende metionina en una concentración de aproximadamente 5.0 mM.

22. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a
25 21, en donde dicho anticuerpo monoclonal anti-CD40 antagonista se selecciona del grupo que consiste de:

a) el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR- 12.12;

b) el anticuerpo monoclonal producido por líneas de células de hibridoma 5.9 o 12.12;

5 c) un anticuerpo monoclonal que comprende secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:6, la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:7, la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:8, la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7, y la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:8;

10 d) un anticuerpo monoclonal que comprende la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:2, la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:4, la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:5, la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:4, y la
15 secuencia mostrada en la SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:5;

e) un anticuerpo monoclonal que tiene la secuencia de aminoácido codificada por una molécula de ácido nucleico que
20 comprende una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1, la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:3, y la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO:3;

25 f) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unir el anticuerpo monoclonal producido por líneas de células de hibridoma 5.9 o 12.12;

g) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia CD40 humana mostrada en la SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 12;

5 h) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia CD40 humana mostrada en la SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 12;

10 i) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitivo;

15 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 de forma recombinante; y

20 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.

25 23. La composición de la reivindicación 22, en donde dicho fragmento se selecciona del grupo que consiste de un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento Fv, y un fragmento Fv de cadena sencilla.

24. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en donde dicho anticuerpo monoclonal anti-CD40 antagonista está presente en dicha composición en una concentración de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 50.0 mg/ml.

25. La composición de la reivindicación 24, en donde dicho anticuerpo monoclonal anti-CD40 antagonista está presente en dicha composición en una concentración de aproximadamente 1.0 mg/ml a aproximadamente 35.0 mg/ml.

26. La composición de la reivindicación 25, en donde dicho anticuerpo monoclonal anti-CD40 antagonista está presente en dicha composición en una concentración de aproximadamente 10.0 mg/ml a aproximadamente 35.0 mg/ml.

27. La composición de la reivindicación 1, en donde dicha composición es estable en una temperatura de aproximadamente 2° C a aproximadamente 8° C durante un periodo de por lo menos 18 meses.

28. La composición de la reivindicación 1, en donde dicha composición es estable en aproximadamente 25° C durante un periodo de por lo menos 3 meses.

29. Una composición farmacéutica líquida estable que comprende un anticuerpo monoclonal anti-CD40 antagonista como un componente terapéuticamente o profilácticamente activo, la arginina en su forma ácida (arginina-HCl) en una

concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM, y un agente de amortiguación para mantener el pH de dicha composición dentro de un rango de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0, en donde dicho agente de amortiguación es amortiguador de citrato de sodio/ácido cítrico en una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM, en donde dicho anticuerpo monoclonal anti-CD40 antagonista se selecciona del grupo que consiste de:

a) el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR- 12.12;

b) el anticuerpo monoclonal producido por líneas de células 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 SEQ ID NO:6, la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:7, la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:8, la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7, y la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:8;

d) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:2, la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:4, la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:5, la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:4, y la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:5;

e) un anticuerpo monoclonal que tiene 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 SEQ ID NO: 1, la
5 secuencia mostrada en la SEQ ID NO:3, y la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO:3;

f) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unir el anticuerpo monoclonal producido por líneas de
10 células de hibridoma 5.9 o 12.12;

g) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia CD40 humana mostrada en la SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 12;

15 h) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia CD40 humana mostrada en la SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 12;

20 i) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitivo;

25 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 de forma recombinante; 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.

30. La composición de la reivindicación 29, en donde dicho fragmento se selecciona del grupo que consiste de un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fv, y un fragmento Fv de cadena sencilla.

31. La composición de la reivindicación 29, en donde dicha composición comprende arginina-HCl en una concentración de aproximadamente 150 mM, y el agente de amortiguación es citrato de sodio/ácido cítrico en una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM, en donde dicha composición has a pH de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 6.0 y una osmolalidad de aproximadamente 250 mmol/kg a aproximadamente 330 mmol/kg.

32. La composición de la reivindicación 29, en donde dicha composición comprende adicionalmente metionina, polisorbato 20, o metionina y polisorbato 20, en donde dicha metionina cuy o está presente está presente en dicha composición en una concentración de aproximadamente 0.5 mM a aproximadamente 20.0 mM, y en donde dicho polisorbato 20 cuy o está presente está presente en dicha composición en una concentración de aproximadamente 0.025% a aproximadamente 0.1 % (p/v).

33. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 29 a 32, en donde dicho anticuerpo monoclonal anti-CD40 antagonista está presente en dicha composición en una
5 concentración de aproximadamente 10.0 mg/ml a aproximadamente 35.0 mg/ml.
34. La composición de la reivindicación 33, en donde dicho anticuerpo monoclonal anti-CD40 antagonista es el anticuerpo
10 monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12.
35. Un método para tratar un sujeto que tiene un cáncer o afección premaligna que se asocia con Las células que expresan CD40, dicho método comprende administrar una
15 cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34.
36. El método de la reivindicación 35, en donde dicho cáncer se
20 caracteriza por crecimiento neoplásico de células B.
37. El método de la reivindicación 36, en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste de linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, linfoma de
25 células B, linfoma de células B grado alto, linfoma de células B grado intermedio, linfoma de células B grado bajo, leucemia linfoblástica aguda de células B, enfermedad de Hodgkin, plasmacitoma, linfoma folicular, linfoma folicular clivado pequeño, linfoma folicular de células grandes,

linfoma clivado pequeño mezclado folicular, linfoma de células clivada pequeña difusa, linfoma linfocítico pequeño difusa, leucemia linfocítica, linfoma limfoplasmacítica, linfoma de zona marginal, linfoma de tejido linfoide asociado con mucosa, linfoma de célula B monocitoide, linfoma de vaso, leucemia de blastocito, linfoma de célula grande difusa, linfoma de célula B grande mediastinal, granulomatosis linfomatoide, linfomatosis intravascular, linfoma de células mezclada difusa, linfoma de célula grande difusa, linfoma inmunoblástico, linfoma de Burkitt, linfoma relacionado con SIDA, Macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma de célula de manto, y enfermedad de cadena pesada.

38. El método de la reivindicación 35, en donde dicho cáncer es no es una malignidad hematológica de célula B.

39. El método de la reivindicación 38, en donde dicha malignidad se selecciona del grupo que consiste de leucemias agudas, leucemias mieloblásticas, leucemias mielocíticas, leucemia promielocíticas, leucemia mielomonocítica, leucemia monocítica, eritroleucemia, leucemia mielocítica leucemia crónica, y vera policitemia.

40. El método de la reivindicación 35, en donde dicho cáncer es un tumor sólido que comprende células neoplásicas que expresan el antígeno CD40.

41. El método de la reivindicación 40, en donde dicho tumor sólido se selecciona del grupo que consiste de carcinoma de

pulmón, carcinoma de mama, carcinoma de ovario, carcinoma de piel, carcinoma de colon, carcinoma de vejiga urinaria, carcinoma de hígado, carcinoma gástrico, carcinoma de próstata, carcinoma de célula renal, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma de célula escamosa, carcinoma papilar tiroide, carcinoma cervical, y sarcomas.

42. El método de la reivindicación 35, en donde dicha afección premaligna es gamopatía monoclonal de significancia no determinada (MGUS).

43. Un método para tratar un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmune que se asocia con las células que expresan CD40, dicho método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34.

44. El método de la reivindicación 43, en donde dicha enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmune se selecciona del grupo que consiste de lupus eritematoso sistémico (SLE), lupus discoide, lupus nefritis, sarcoidosis, artritis juvenil, artritis reumatoide, artritis soriática, síndrome de Reiter, espondilitis anquilosante, artritis gotosa, rechazo de un trasplante de tejido u órgano, enfermedad de injerto vs. Anfitrión, esclerosis múltiple, síndrome de hiper IgE, poliarteritis nodosa, cirrosis biliar primaria, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, celiaquía (enteropatía sensible al gluten), hepatitis autoinmune,

anemia perniciosa, anemia hemolítica autoinmune, soriasis, escleroderma, miastenia gravis, púrpura trombocitopénica autoinmune, tiroiditis autoinmune, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad compleja inmune, síndrome de disfunción inmune de fatiga crónica (CFIDS), polimiositis y dermatomiositis, crioglobulinemia, trombolisis, cardiomiopatía, pemphigus vulgaris, fibrosis intersticial pulmonar, sarcoidosis, diabetes mellitus Tipo I y Tipo II diabetes, hipersensibilidad tipo 1, 2, 3, y 4 de tipo retardada, alergia o trastornos alérgicos, asma, síndrome de Churg-Strauss (granulomatosis alérgica), dermatitis atópica, dermatitis de contacto alérgica e irritante, urticaria, alergia mediada por IgE, aterosclerosis, vasculitis, miopatías inflamatorias idiopáticas, enfermedad hemolítica, enfermedad de Alzheimer, y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica.

45. Un método para incrementar la estabilidad de un anticuerpo monoclonal anti-CD40 en una composición farmacéutica líquida, dicho método comprende formular dicha composición al combinar dicho anticuerpo monoclonal anti-CD40, una cantidad suficiente de arginina-HCl para producir que dicha composición sea casi isotónica, y un agente de amortiguación para mantener el pH de dicha composición entre aproximadamente pH 5.0 y aproximadamente pH 7.0, en donde dicho agente de amortiguación es un amortiguador de citrato/ácido cítrico.

46. Un método para preparar una composición farmacéutica líquida que comprende un anticuerpo monoclonal anti-CD40, dicho método comprende formular dicha composición al combinar dicho anticuerpo monoclonal anti-CD40, una cantidad de arginina en su forma ácida (arginina-HCl) suficiente para hacer producir que dicha composición sea casi isotónica, y un agente de amortiguación para mantener el pH de dicha composición entre aproximadamente pH 5.0 y aproximadamente pH 7.0, en donde dicho agente de amortiguación es un amortiguador de citrato/ácido cítrico.

47. El método de la reivindicación 45 o 46, en donde dicha composición tiene una osmolalidad de aproximadamente 240 mmol/kg a aproximadamente 360 mmol/kg.

48. El método de la reivindicación 45 o 46, en donde la concentración de dicho agente de amortiguación es de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM, y aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM de arginina-HCl se combina con dicho anticuerpo monoclonal anti-CD40 y dicho agente de amortiguación.

49. El método de la reivindicación 48, en donde la concentración de dicho agente de amortiguación es de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM, y aproximadamente 100 mM a aproximadamente 175 mM de arginina-HCl se combina con dicho anticuerpo monoclonal anti-CD40 y dicho agente de amortiguación.

50. El método de la reivindicación 49, en donde la concentración de dicho agente de amortiguación es de aproximadamente 10 mM, y aproximadamente 150 mM de arginina-HCl se combina con dicho anticuerpo monoclonal anti- CD40 y dicho agente de amortiguación.

51. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 45 a 50, en donde dicho agente de amortiguación es un amortiguador de citrato de sodio/ácido cítrico.

52. El método de la reivindicación 51, en donde dicha composición tiene un pH de aproximadamente pH 5.5.

53. El método de la reivindicación 45 o 46, en donde dicha composición se formula para comprender adicionalmente metionina, polisorbato 20, o metionina y polisorbato 20, en donde dicha metionina cuy o está presente está presente en dicha composición en una concentración de aproximadamente 0.5 mM a aproximadamente 20.0 mM, y en donde dicho polisorbato 20 cuy o está presente está presente en dicha composición en una concentración de aproximadamente 0.025% a aproximadamente 0.1 % (p/v).

54. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 45 a 53, en donde dicho anticuerpo monoclonal anti-CD40 antagonista se selecciona del grupo que consiste de:

a) el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12;

b) el anticuerpo monoclonal producido por líneas de células de hibridoma 5.9 o 12.12;

5 c) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:6, la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:7, la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:8, la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7, y la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:8;

10 d) un anticuerpo monoclonal que comprende secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:2, la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:4, la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:5, la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:4, y la
15 secuencia mostrada en la SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:5;

e) un anticuerpo monoclonal que tiene una secuencia de aminoácido codificada por una molécula de ácido nucleico que
20 comprende una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1, la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:3, y la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO:3;

25 f) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unir el anticuerpo monoclonal producido por líneas 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 SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 12;

5 h) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia CD40 humana mostrada en la SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 12;

10 i) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitivo;

15 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 de forma recombinante; y

20 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.

55. El método de la reivindicación 54, en donde dicho fragmento
25 se selecciona del grupo que consiste de un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento Fv, y un fragmento Fv de cadena sencilla.

56. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 45 a 55, en donde dicho anticuerpo monoclonal anti-CD40 antagonista está presente en dicha composición en una concentración de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 50.0 mg/ml.

5

57. El método de la reivindicación 56, en donde dicho anticuerpo monoclonal anti-CD40 antagonista está presente en dicha composición en una concentración de aproximadamente 10.0 mg/ml a aproximadamente 35.0 mg/ml.

10

58. Una composición farmacéutica líquida estable que comprende el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o fragmentos de unión a antígeno de este, como un componente terapéuticamente o profilácticamente activo, la arginina en su forma ácida (arginina-HCl) en una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM, y un agente de amortiguación para mantener el pH de dicha composición dentro de un rango de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0, en donde dicho agente de amortiguación es amortiguador de citrato de sodio/ácido cítrico en una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM.

15

20

59. Un método para tratar un sujeto que tiene un cáncer o afección premaligna que se asocia con las células que expresan CD40, dicho método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de la reivindicación 58.

25

60. Un método para tratar un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmune que se asocia con las células que expresan CD40, dicho método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de la reivindicación 58.

61. Un método para incrementar la estabilidad del anticuerpo monoclonal CHIR- 12.12 o CHIR-5.9, o fragmento de unión a antígeno de este, en una composición farmacéutica líquida, dicho método comprende formular dicha composición al combinar dicho anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno de este con aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM de arginina en su forma ácida (arginina-HCl) y un agente de amortiguación para mantener el pH de dicha composición entre aproximadamente pH 5.0 y aproximadamente pH 7.0, en donde dicho agente de amortiguación es amortiguador de citrato de sodio/ácido cítrico en una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM.

62. Un método para preparar una composición farmacéutica líquida que comprende el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o fragmento de unión a antígeno de este, dicho método comprende formular dicha composición al combinar dicho anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno de este con aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM de arginina en su forma ácida (arginina-HCl) y un agente de amortiguación para mantener el pH de dicha composición entre aproximadamente pH 5.0 y aproximadamente pH 7.0, en donde

dicho agente de amortiguación es amortiguador de citrato de sodio/ácido cítrico en una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS DE ANTICUERPO ANTAGONISTA ANTI-CD40**RESUMEN**

5 Se suministran composiciones farmacéuticas líquidas estables que comprenden un anticuerpo antagonista anti-CD40 como un componente terapéutica o profilácticamente activo y métodos útiles en su preparación. Estas composiciones comprenden el anticuerpo antagonista CD40, un agente amortiguador para mantener el pH de
10 la composición entre aproximadamente pH 5.0 y aproximadamente pH 7.0, y una cantidad de arginina HCl suficiente para hacer la composición líquida aproximadamente isotónica. Las composiciones farmacéuticas que contienen el anticuerpo antagonista anti-CD40 líquidas estables de la invención encuentran uso en métodos para
15 tratar enfermedades proliferativas y enfermedades que tienen un componente autoinmune y/o inflamatorio.

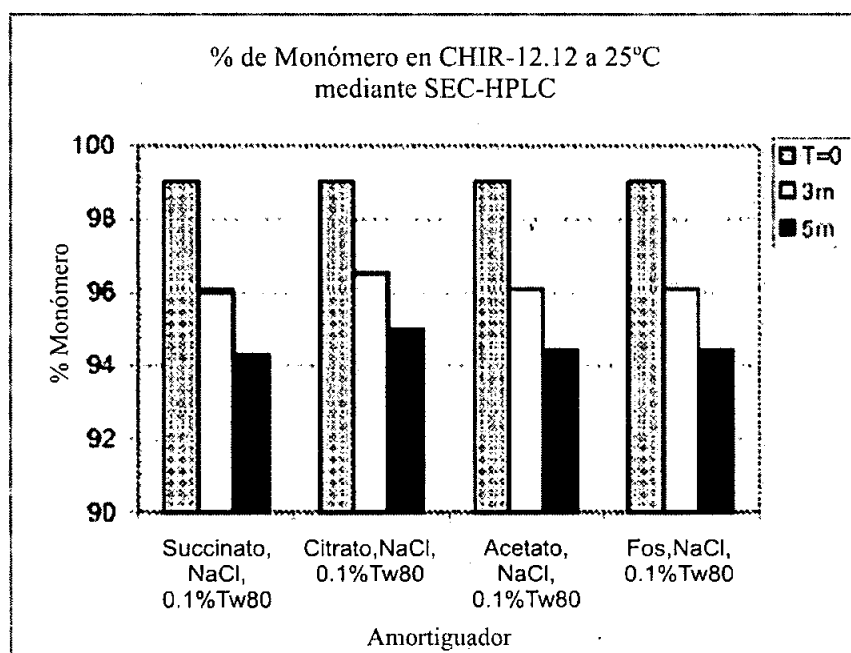


FIGURA 1

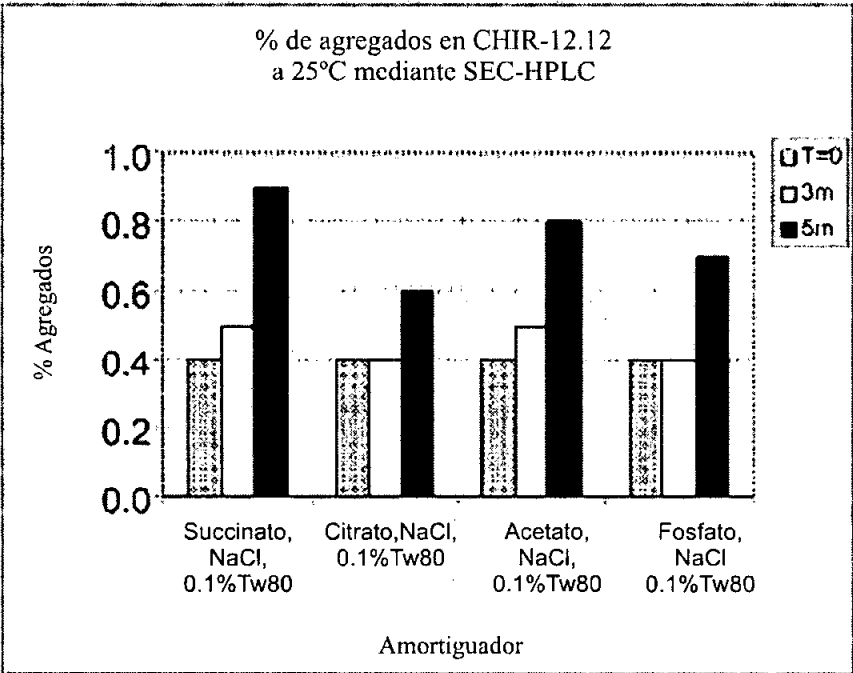


FIGURA 2

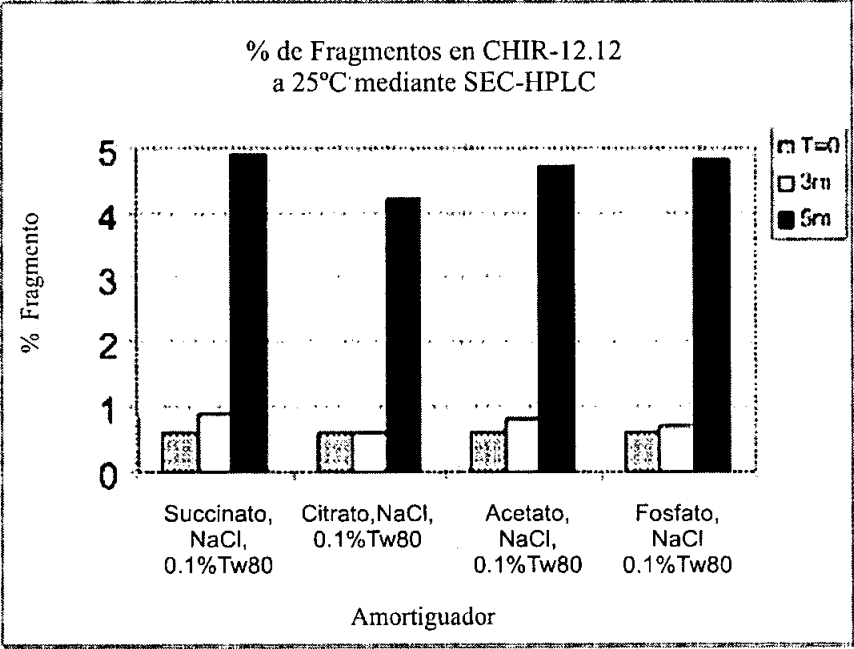


FIGURA 3

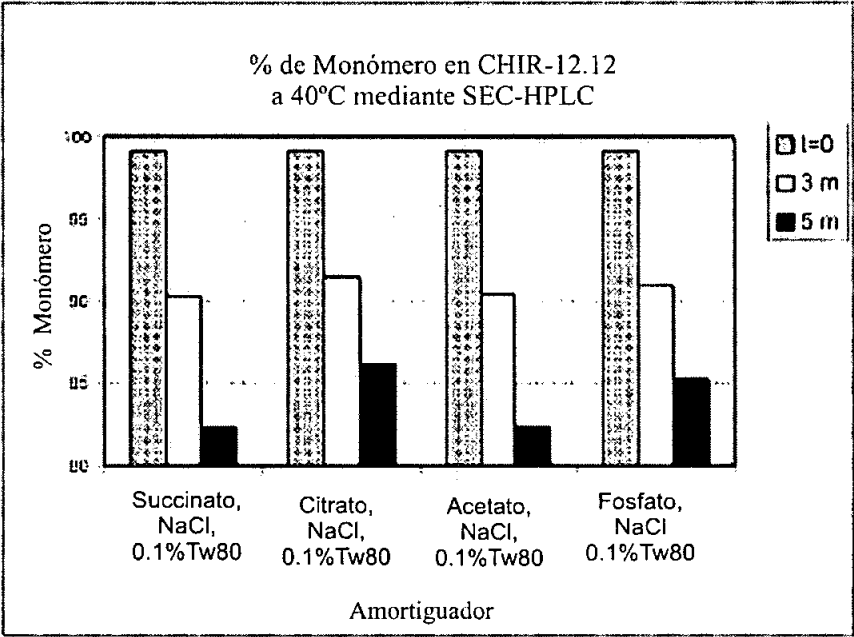


FIGURA 4

000006

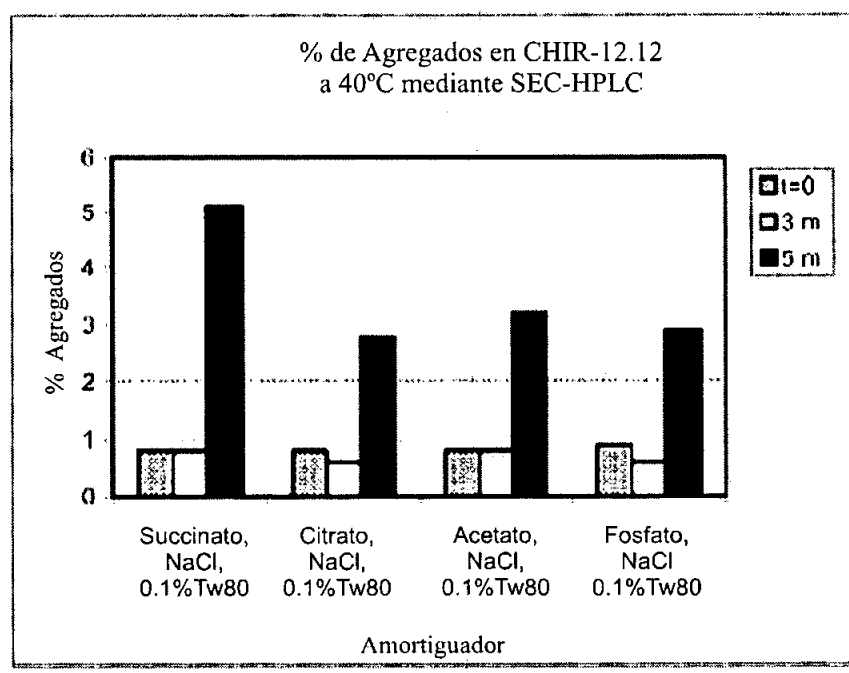


FIGURA 5

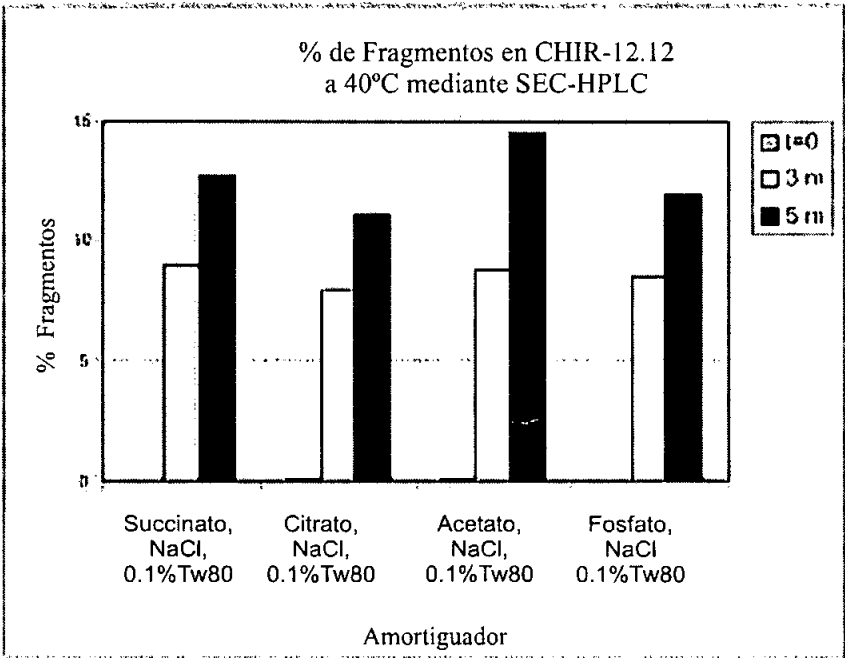


FIGURA 6

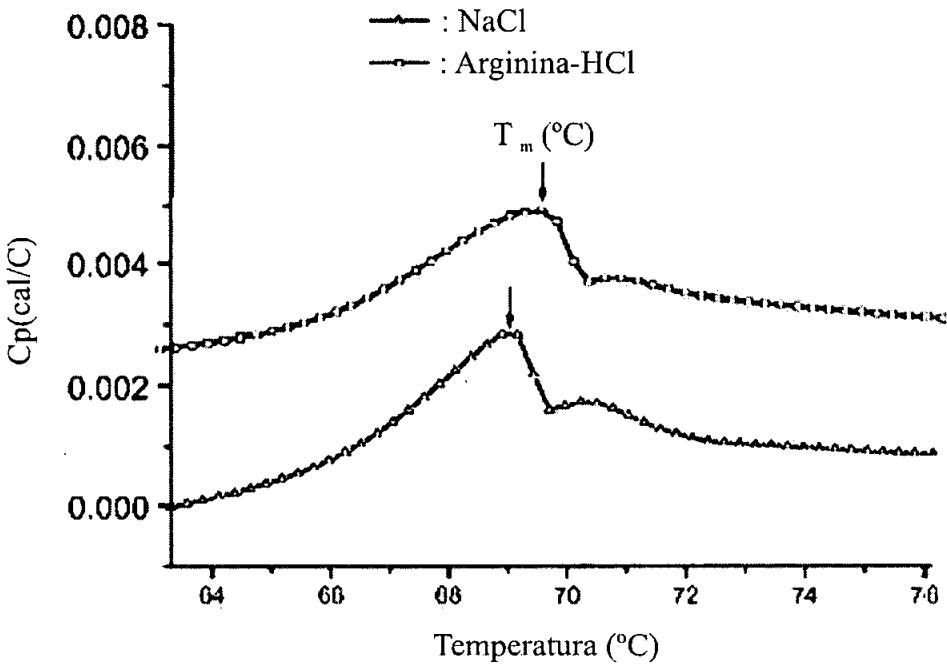


FIGURA 7

nnnng

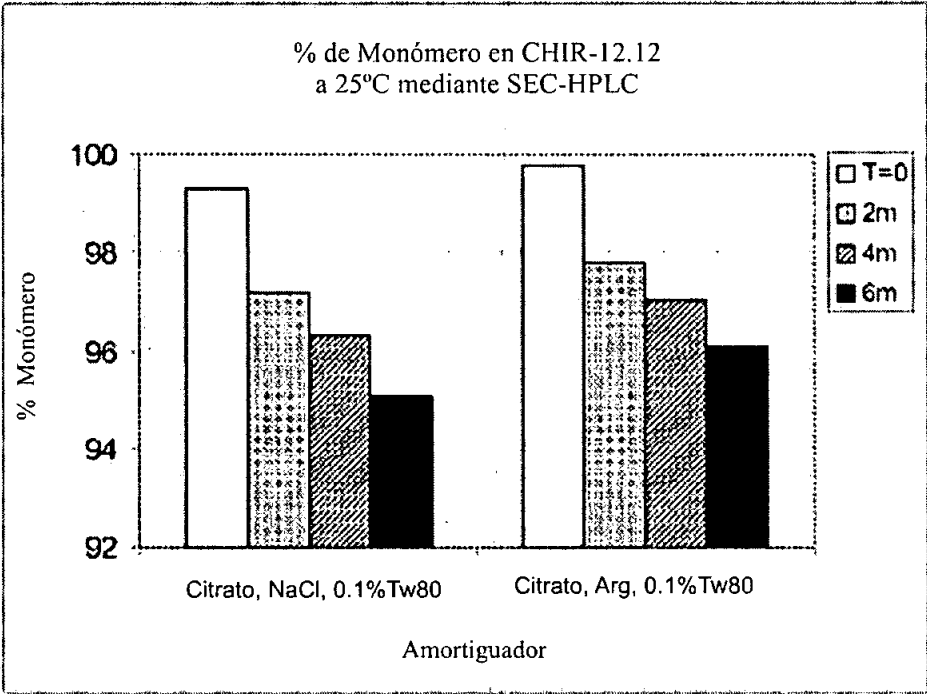


FIGURA 8

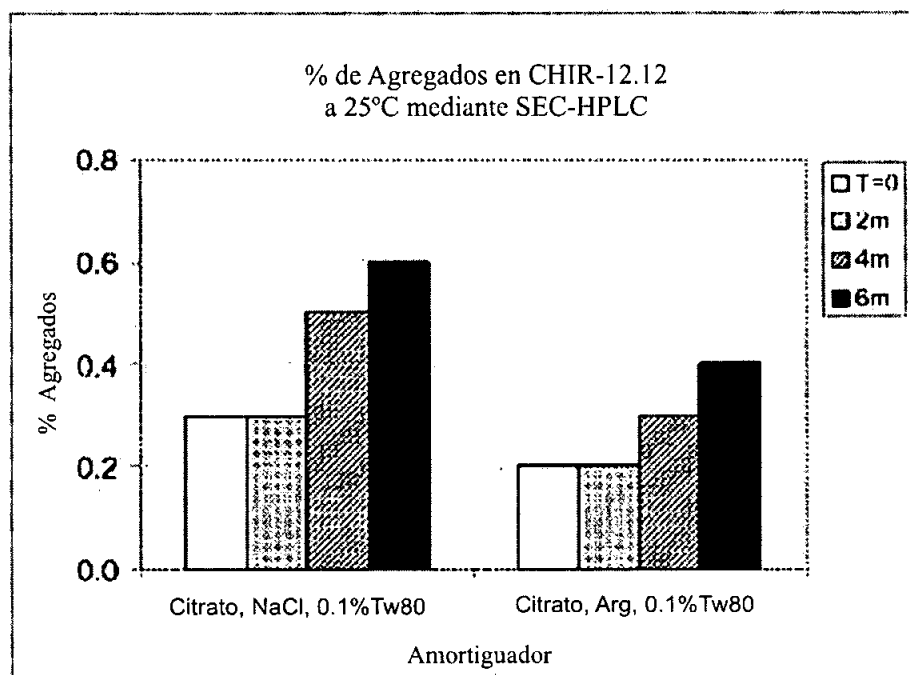


FIGURA 9

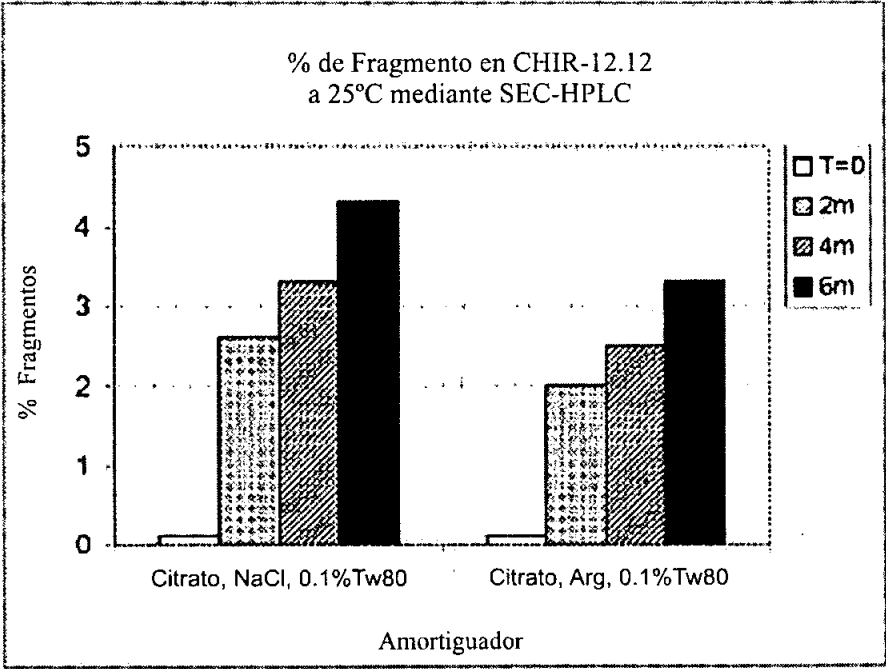


FIGURA 10

00092

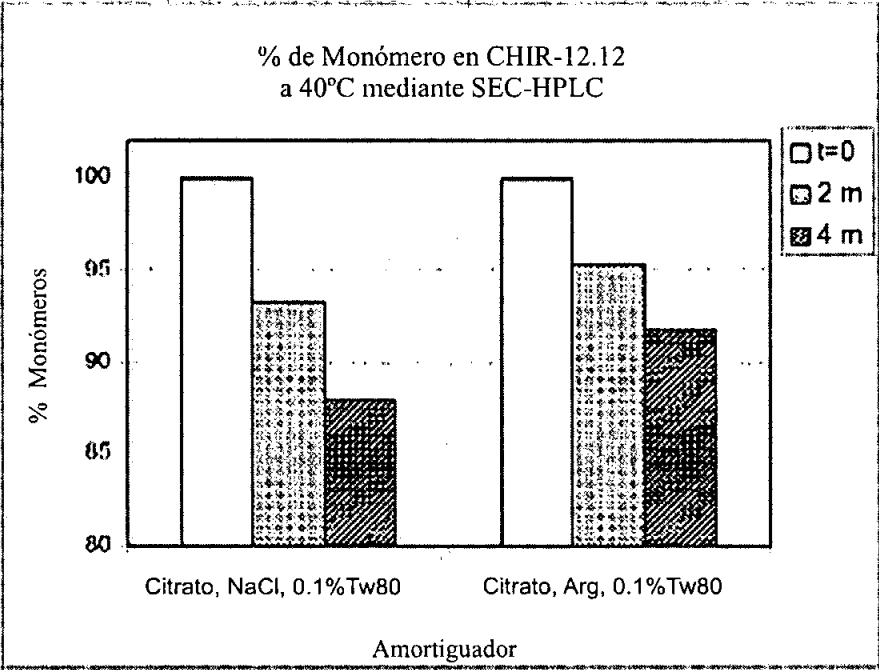


FIGURA 11

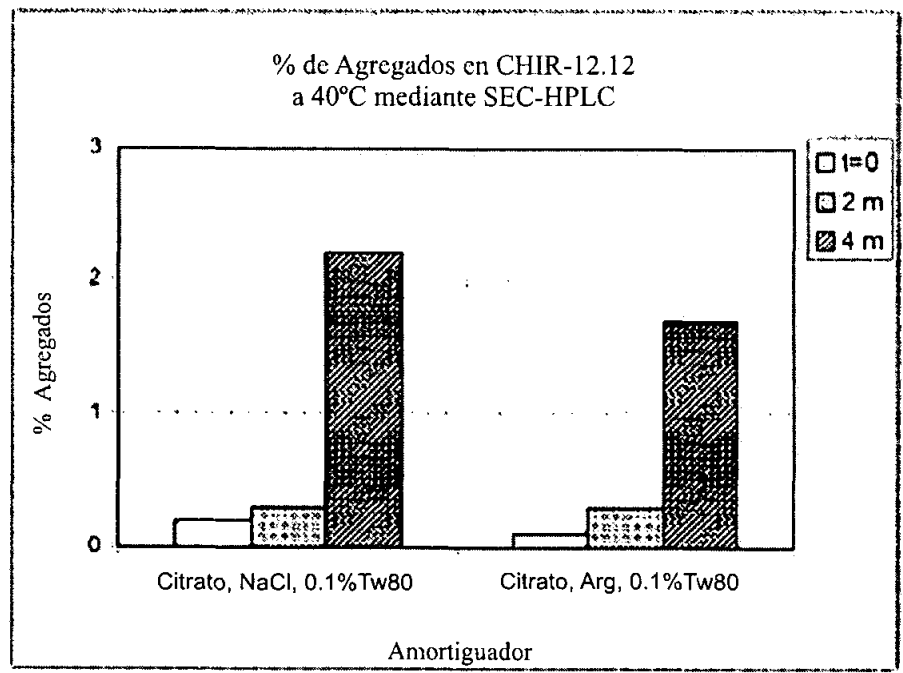


FIGURA 12

nn294

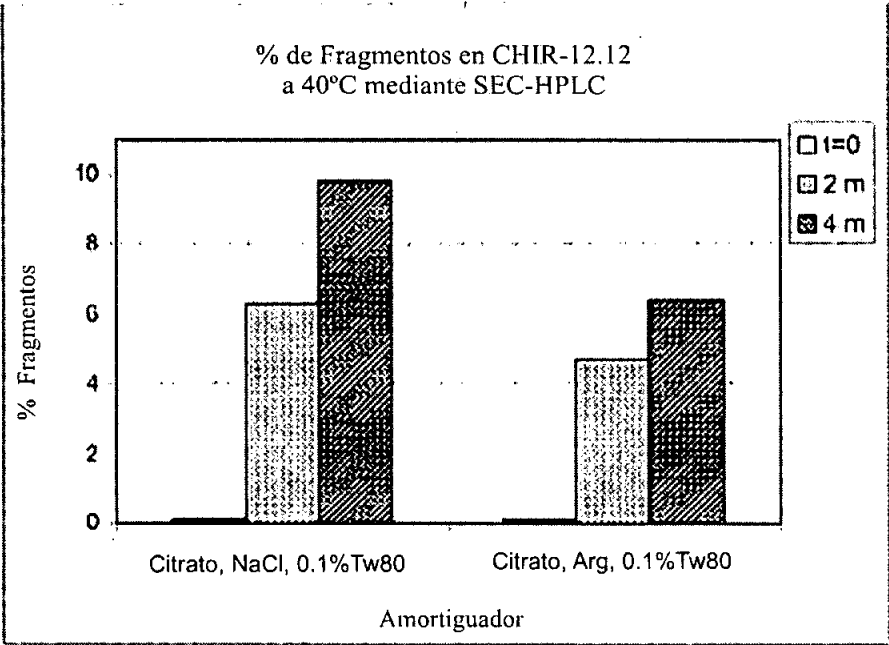


FIGURA 13

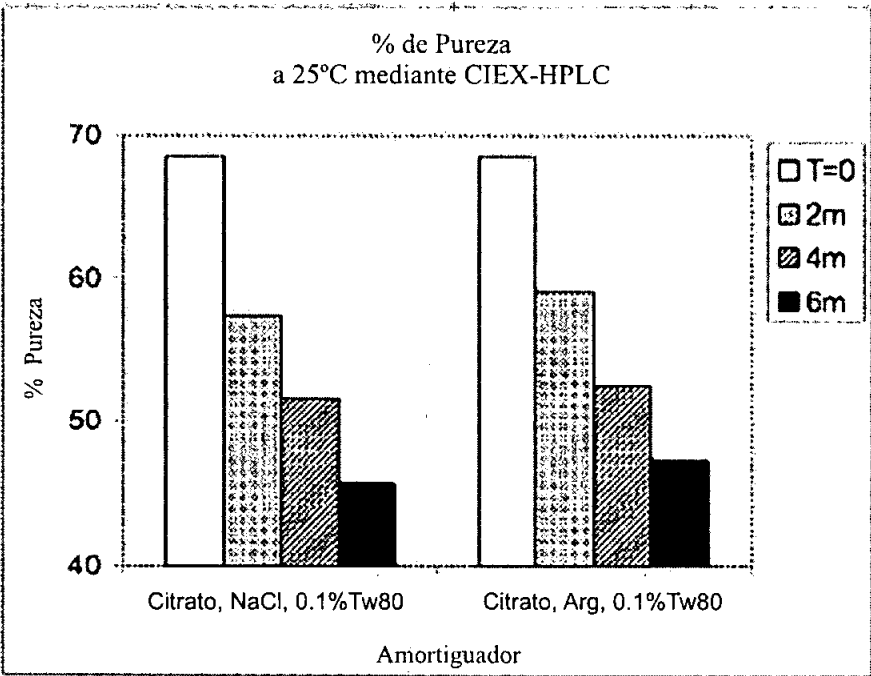


FIGURA 14

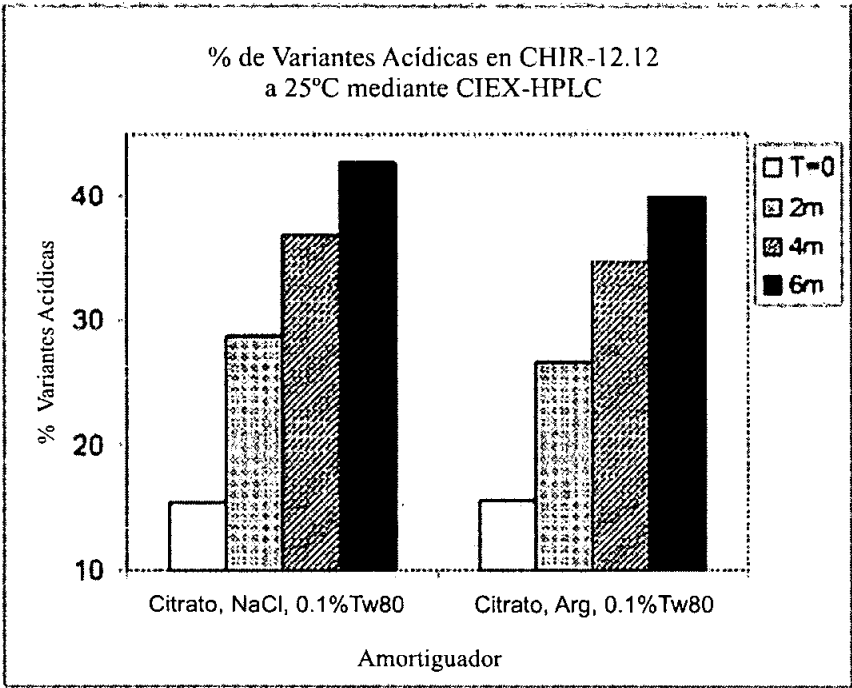


FIGURA 15

2

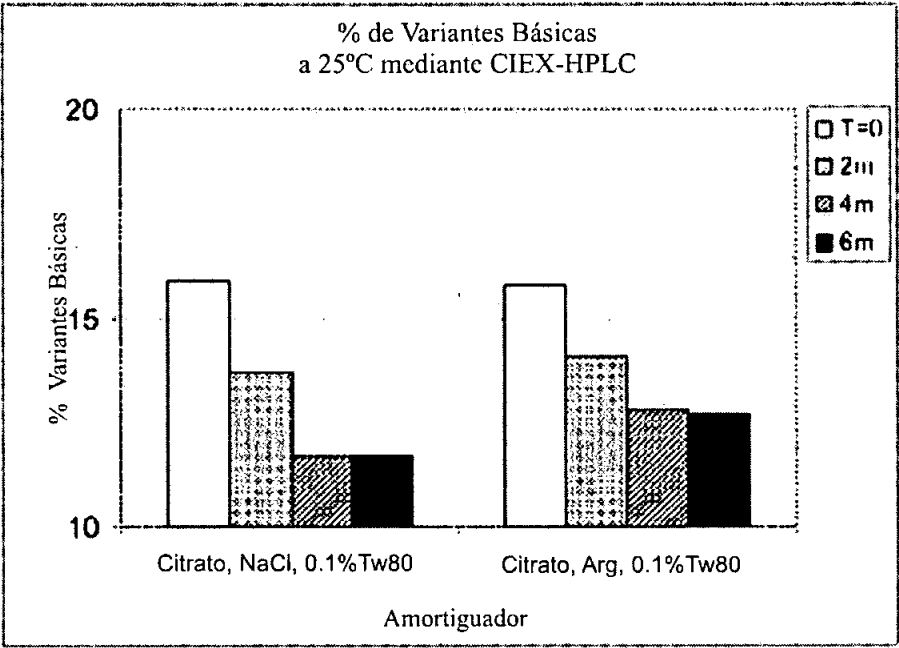


FIGURA 16

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Lu, Xiaofeng
Chen, Bao-Lu
Araya, Kidisti
Okhamafe, Augustus

<120> COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS DE ANTICUERPO ANTAGONISTA ANTI-CD40

<130> PP028228.0002 (325023)

<150> 60/794,011
<151> 2006-04-21

<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	

SEQLISTPP028228 0002(325023).TXT

SEQUENCE LISTING

<110> Lu, Xiaofeng
Chen, Bao-Lu
Araya, Kidisti
Okhamafe, Augustus

<120> Antagonist Anti-CD40 Antibody Pharmaceutical Compositions

<130> PP028228.0002 (325023)

<150> 60/794,011

<151> 2006-04-21

<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	ggt	ggg	ggt	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					

SEQLISTPP028228 0002(325023).TXT

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 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

00401

SEQLISTPP028228 0002(325023).TXT

<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	tgc	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	tgc	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	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				

SEQLISTPP028228 0002(325023).TXT

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	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

SEQLISTPP028228 0002(325023).TXT

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

nn04

SEQLISTPP028228 0002(325023).TXT

<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

SEQLISTPP028228 0002(325023).TXT

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	

SEQLISTPP028228 0002(325023).TXT

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	

SEQLISTPP028228 0002(325023).TXT

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

```
<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 Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu	5 10 15
Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu val	20 25 30 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	

Page 9

SEQLISTPP028228 0002(325023).TXT
 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

SEQLISTPP028228 0002(325023).TXT

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	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															

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT		410	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C07K 16/28			
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) NOVARTIS AG Y XOMA TECHNOLOGY LTD			
(30) Prioridad	(31) No. 60/794,011	32) Fecha 21.04.2006	(33) País US	(72) Inventor(es) LU, Xiaofeng CHEN, Bao-Lu y otros	
				(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 21/11/08		(87) Publicación internacional			
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 01.11.2007			
Fecha de presentación de la solicitud: 17.04.2007		N° publicación: WO/2007/124299			
No. de solicitud PCT/US2007/066757					
(54) Título: COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS DE ANTICUERPO ANTAGONISTA ANTI-CD40					

Reivindicación(es):

1. Una composición farmacéutica líquida estable que comprende:

- a) un anticuerpo monoclonal anti-CD40 antagonista como un componente terapéuticamente o profilácticamente activo, en donde dicho anticuerpo monoclonal es capaz de unirse específicamente a un antígeno CD40 de humano expresado sobre la superficie de de una célula B humana, dicho anticuerpo monoclonal está libre de actividad agonista significativa cuy o se une al antígeno CD40 expresado sobre la superficie de dicha célula B;
- b) una cantidad de arginina en su forma ácida (arginina-HCl) suficiente para hacer que dicha composición sea casi isotónica; y
- c) un agente de amortiguación para mantener el pH de dicha composición dentro de un rango de aproximadamente pH 5.0 a aproximadamente pH 7.0, en donde dicho agente de amortiguación es un amortiguador de citrato/ácido cítrico.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION: _____ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD _____ DISEÑO INDUSTRIAL _____

11

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional: C07K 16/28

(71) Solicitante(s) **NOVARTIS AG Y XOMA TECHNOLOGY LTD**

(72) Inventor(es) LU, Xiaofeng; CHEN, Bao-Lu; ARAYA, Kidisti; OKHAMAFE, Augustus.

(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDÓÑEZ

(30) Prioridad

(31) No. Prioridad

32)

Fecha

(33) País

60/794,011

21.04.2006

US

(85) Fecha inicio fase nacional: 21/11/08

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: 01.11.2007

Fecha de presentación de la solicitud: 17.04.2007

N° publicación: WO/2007/124299

No. de solicitud PCT/US2007/066757

7 Titulo: **COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS DE ANTICUERPO ANTAGONISTA ANTI-CD40**