



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 816**

51 Int. Cl.:
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02719260 .8**
96 Fecha de presentación : **14.03.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1383532**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.01.2004**

54 Título: **Terapia de combinación.**

30 Prioridad: **02.04.2001 US 280805 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.09.2011

73 Titular/es: **GENENTECH, Inc.**
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

72 Inventor/es: **Grewal, Iqbal**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 364 816 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Terapia de combinación

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 **[0001]** La presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades o trastornos caracterizados por células que expresan el antígeno de superficie CD40 y especialmente al tratamiento de un neoplasma o enfermedad o trastorno autoinmune caracterizados por células que expresan el antígeno de superficie CD40. La presente invención da a conocer composiciones para utilizar en métodos para el tratamiento de varias enfermedades o trastornos caracterizados por células que expresan CD40 con una combinación de un agente que detiene el crecimiento, destruye o causa la eliminación de células que expresan CD40 y un segundo agente que detiene el crecimiento, destruye o causa la eliminación de células que expresan el antígeno de superficie CD20. También se dan a conocer composiciones farmacéuticas y artículos de fabricación, tales como kits que comprenden los agentes y combinaciones de los mismos.

20 Descripción de divulgaciones relacionadas

25 **[0002]** CD40 es una glicoproteína de membrana integral de tipo I y un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF). CD40 se expresa en una variedad de tipos de células incluyendo células B normales y células B neoplásicas, células interdigitantes, células epiteliales basales y carcinomas. También está presente en macrófagos, algunas células endoteliales y células dendríticas foliculares. CD40 se expresa temprano en la ontogenia de células B, apareciendo en precursores de células B posteriormente a la aparición de CD10 y CD19, pero antes de CD20 y la inmunoglobulina de superficie (Ig) (Uckun et al., (1990) Blood 15:2449). Aunque divulgaciones anteriores indicaron que la CD40 se perdía tras la diferenciación terminal de células B en células plasmáticas, se ha detectado en células de plasma derivadas de amígdala y médula ósea (Pellat-Decounynck et al., (1994) Blood 84:2597).

30 **[0003]** La interacción de CD40 con su ligando, CD40L (también referido como gp39) es vital para el desarrollo de respuestas inmunes tanto humorales como mediadas por la célula. El CD40L una proteína transmembrana expresada predominantemente en linfocitos T activados. Como las proteínas TNF, la estructural del CD40L es un trímero no covalente. La señalización mediada por CD40 parece ser un requisito para la proliferación de células B, el cambio de isotipos, el compromiso de la formación de centros germinales y células B de memoria en respuesta a antígenos dependientes de células T. La unión al receptor de CD40L da lugar a la multimerización de CD40, la generación de señales de activación (para células presentadoras de antígeno, tales como células dendríticas, monocitos y células B) y la generación de señales de crecimiento y diferenciación (para células epiteliales y fibroblastos activados por citoquinas). Aunque los mecanismos de señalización utilizados por la molécula CD40 en la regulación del destino celular no se ha elucidado completamente, las señales de CD40 se transducen a partir del receptor multimerizado a través del reclutamiento de una serie de factores asociados con el receptor de TNF ("TRAFs") (Kehry, (1996) J. Immunol. 156:2345-2348). Los subgrupos de TRAFs interaccionan diferencialmente con los miembros de la familia de TNF, incluyendo CD40, para proporcionar estímulos a una amplia variedad de mecanismos en cascada. TRAF1 y TRAF2 están implicados en la modulación de apoptosis. (Speiser et al., (1997) J. Exp. Med. 185:1777-1783; Yeh et al., (1997) Immunity 7:715-725). TRAFs 2, 5 y 6 participan en los actos de proliferación y activación. En células B normales, la unión de CD40 recluta TRAF2 y TRAF3 al complejo de receptores e induce el desfavorecimiento de la expresión de otros TRAFs (Kuhune et al., (1997) J. Exp. Med. 186:337-342).

50 **[0004]** La apoptosis y la señalización mediada por CD40 están estrechamente unidas durante el desarrollo y la diferenciación de células B. Una función principal de la apoptosis en las células B es la eliminación clonal de células B inmaduras que se cree que es resultado de amplia reticulación de Ig de superficie en células B inmaduras. El destino de las células B maduras también está modulado por una combinación de señalización a través de Ig de superficie y señales derivadas de células T activadas, presumiblemente mediada por moléculas CD40L. Se ha observado que la combinación de señales de Ig de superficie y CD40 anula el mecanismo apoptótico y mantiene la supervivencia de células B del centro germinal. Este rescate de la apoptosis en centros germinales es crítico para el desarrollo células B de memoria productores de anticuerpos de afinidad elevada.

60 **[0005]** Tanto en afecciones malignas de células T como células B, los efectos antitumorales (detención del crecimiento con o sin apoptosis) a menudo dan resultado cuando las células malignas se exponen a estímulos que conducen a la activación de linfocitos normales. Esta detención del crecimiento inducida por la activación se ha observado con señales a través de receptores de antígeno o receptores coestimuladores (Ashwell et al., (1987) Science 237:61; Bridges et al., (1987) J. Immunol. 139:4242; Page y Defranco (1988) J. Immunol. 140:3717 y

Beckwith et al., (1990) J. Natl. Cancer Inst. 82:501). La estimulación de CD40 por anticuerpo o ligando soluble inhibe directamente el crecimiento de linfomas de células B (Funakoshi et al., (1994) Blood 83: 2787-2794).

5 [0006] Se han descrito anticuerpos monoclonales (mAb) dirigidos contra CD40 (Katira et al., "CD40 Workshop Panel Report" in Leukocyte Typing V, Schlossman et al., (Eds) 1995; 1:547-550). Por ejemplo, se seleccionaron dos mAb, CD40.7 (M2) y CD40.8 (M3), en base a su capacidad de inhibir la unión de CD40 a células que expresan CD40L (Fanslow et al., Leukocyte Typing V, Schlossman et al., (Eds) 1995, 1:555-556). La estimulación de CD40 por mAb M2 y M3 inhibe el crecimiento de varios linfomas de células B e induce la regresión de tumores in vivo establecidos (Funakoshi et al., (1994) Blood 83: 2787-2794; Funakoshi et al., (1996) J. Immunol. 19: 93-101). Las inmunotoxinas de cadena sencilla basadas en mAb G28-5 matan selectivamente a células malignas que expresan CD40 in vitro (Francisco et al., (1997) J Biol. Chem. 39: 24165-24169). La Publicación Internacional Número WO 00/75348 describe el uso de formas recombinantes de anticuerpo S2C6 dirigido a CD40 en el tratamiento de varios trastornos, incluyendo cáncer. Además de liberar una señal estimuladora, el anticuerpo aumenta la interacción entre CD40 y CD40L. La Publicación Internacional Número WO 95/17202 describe el uso de anticuerpos que se unen a CD40 en la conformación correcta en el tratamiento o prevención de una enfermedad caracterizada por células neoplásicas que expresan CD40.

20 [0007] El antígeno CD20 (también denominado antígeno de diferenciación limitado a linfocito B humano, Bp35) es una proteína transmembrana hidrofóbica con un peso molecular de aproximadamente 35 kD localizado en pre-linfocitos B y linfocitos B maduros (Valentine et al. J. Biol. Chem. 264 (19):11282-11287 (1989); and Einfeld et al. EMBO J. 7 (3):711-717 (1988)). El antígeno también se expresa en más del 90% de linfomas no de Hodgkin (NHL) de células B (Anderson et al. Blood 63(6):1424-1433 (1984)), pero no se halla en células madre hematopoyéticas, pro-células B, células de plasma normales u otros tejidos normales (Tedder et al. J. Immunol. 135(2):973-979 (1985)). El CD20 regula una etapa o etapas anteriores en el proceso de activación para el inicio y diferenciación del ciclo celular (Tedder et al., supra) y posiblemente funciona como canal de iones de calcio (Tedder et al. J. Cell. Biochem. 14D:195 (1990)).

30 [0008] Un anticuerpo anti-CD20, rituximab (marca RITUXAN®), es un anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano modificado genéticamente dirigido contra el antígeno CD20. Rituximab es el anticuerpo denominado "C2B8" en la Patente de Estados Unidos No. 5,736,137 concedida el 7 de abril de 1998 (Anderson et al.). El anticuerpo se indica para el tratamiento de pacientes con un linfoma no de Hodgkin de células B, positivo de CD20, de grado bajo o folicular recidivante o refractario. Se realizó un estudio abierto de agotamiento de linfocitos B a través del tratamiento con rituximab en pacientes con artritis reumatoide, sugiriendo los resultados que el agotamiento en linfocitos B puede ser una terapia eficaz (Edwards y Cambridge (2001) Rheumatology 40:205-211). Los estudios del mecanismo de acción in vitro han demostrado que el anticuerpo se une al complemento humano y lisa las líneas de células B linfoides a través de la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) (Reff et al. Blood 83(2) :435-445 (1994)). Adicionalmente, presenta una actividad significativa en ensayos para citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Más recientemente, se ha observado que tiene efectos antiproliferativos en ensayos de incorporación de timidina tritiada y que induce la apoptosis directamente, mientras que otros anticuerpos CD20 no lo hacen (Maloney et al. Blood 88(10):637a (1996)). También se ha observado experimentalmente la sinergia entre el Rituximab y quimioterapias y toxinas. En particular, el Rituximab sensibiliza las líneas celulares de linfomas de células B humanas citotóxicas resistentes a fármacos a los efectos citotóxicos de la doxorubicina, CDDP, VP-16, toxina de la difteria y ricina (Demidem et al. Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals 12(3):177-186 (1997)). In vivo, estudios preclínicos han demostrado que se agota en células B de la sangre periférica, nódulos linfáticos y médula ósea de monos cynomolgus, presumiblemente a través de complemento y procesos mediados por células (Reff et al. Blood 83(2): 435-445 (1994)).

Descripción resumida de la invención

50 [0009] La presente invención comprende composiciones para utilizar en el tratamiento de enfermedades y trastornos caracterizados por células que expresan el antígeno de superficie CD40. En aspectos preferidos, la invención se refiere a composiciones para utilizar en el tratamiento de enfermedades o trastornos donde la detención o agotamiento del crecimiento de células B proporciona un resultado beneficioso, tal como la ralentización de la progresión de la enfermedad, el alivio de uno o más síntomas de la enfermedad o la remisión, prevención o curación de la enfermedad o trastorno. Aspectos particulares se refieren al tratamiento de varias enfermedades o trastornos neoplásicos, tales como varias afecciones malignas hematológicas y ciertas otras enfermedades o trastornos donde se indica el agotamiento de células B, tales como, por ejemplo, varios trastornos autoinmunes, tales como artritis reumatoide y lupus eritematoso. En realizaciones particulares, la invención proporciona composiciones para utilizar en métodos para el tratamiento de varias enfermedades o trastornos caracterizados por células que expresan CD40 que comprenden la administración de un agente que detiene el crecimiento o provoca la eliminación de células que expresan CD40 en combinación con un segundo agente que detiene el crecimiento o provoca la eliminación de células que expresan el antígeno de membrana CD20.

[0010] Según una realización preferida, el tratamiento de una enfermedad o trastorno neoplásico o una enfermedad o trastorno autoinmune caracterizados por células que expresan CD40. El método comprende las etapas de administrar a un mamífero con necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que detiene el crecimiento o provoca la eliminación de células que expresan la glicoproteína de membrana CD40 en combinación con un agente que detiene el crecimiento o provoca la eliminación de células que expresan el antígeno de membrana CD20. Según aspectos preferidos, el agente que detiene el crecimiento o provoca la eliminación de células que expresan el antígeno CD40 es un agente que se une a la glicoproteína CD40 de la superficie celular, tales como un anticuerpo u otro ligando dirigido al receptor, tal como el trímero ligando CD40. El agente que detiene el crecimiento o provoca la eliminación de células que expresan el antígeno de membrana CD20 es un anticuerpo dirigido contra CD20 que se une a CD20 y detiene el crecimiento o provoca el agotamiento de células que expresan CD20.

[0011] Los aspectos preferidos de la invención proporcionan composiciones para el tratamiento de una enfermedad o trastorno neoplásico caracterizado por células que expresan el antígeno de superficie CD40, por ejemplo, para el tratamiento de varias afecciones malignas hematológicas y varios tumores sólidos. Los aspectos preferidos de la invención proporcionan el tratamiento de un linfoma o un mieloma caracterizado por células que expresan el antígeno de superficie CD40, por ejemplo, un linfoma de tipo no de Hodgkin y mieloma múltiple.

[0012] También se describen kits y artículos de fabricación. Los kits y artículos de fabricación incluyen preferiblemente:

(a) uno o más recipientes;

(b) un marcador en cada uno de dicho recipiente; y

(c) una primera y segunda composición que comprenden un agente activo contenido en dichos recipientes; donde las composiciones son eficaces para tratar una enfermedad o trastorno caracterizados por células que expresan CD40, tales como una enfermedad o trastorno neoplásico o autoinmune, el marcador en dicho recipiente puede indicar que la composición se puede utilizar para tratar dicho trastorno, y el agente activo en dicha primera composición comprende un agente que detiene el crecimiento o provoca la eliminación de células que expresan el antígeno CD40 y el agente activo en dicha segunda composición comprende un agente que detiene el crecimiento o provoca la eliminación de células que expresan el antígeno CD20. Los agentes son anticuerpos. Los kits incluyen opcionalmente componentes accesorios, tales como un recipiente adicional que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable e instrucciones para utilizar las composiciones para tratar una enfermedad o trastorno particular.

Breve descripción de los dibujos

[0013]

Figura 1. Comparación de actividad antitumoral de anticuerpo anti-CD40 humanizado y un anticuerpo anti-CD20 (marca RITUXAN®) contra el linfoma de Ramos transplantado en ratones SCID.

Figura 2. Comparación de actividad antitumoral de anticuerpo anti-CD40 murino (SGN-14) y un anticuerpo anti-CD20 (marca RITUXAN®) contra el linfoma de Ramos transplantado en ratones SCID.

Figura 3. Actividad antitumoral de un anticuerpo anti-CD20 (marca RITUXAN®) y anticuerpo anti-CD40 humanizado contra IM9, (mieloma múltiple CD20+, CD40+) transplantado en ratones SCID.

Figura 4. Combinación de un anticuerpo anti-CD20 (marca RITUXAN®) y un anticuerpo anti-CD40 murino (SGN-14) para actividad antitumoral contra H.S. Sultan, (Mieloma múltiple CD20+, CD40+) transplantado en ratones SCID.

Figura 5. Actividad antitumoral de un anticuerpo anti-CD40 murino (SGN-14) y un anticuerpo anti-CD20 (marca RITUXAN®) en la marca RITUXAN® resistente a linfoma de Ramos transplantado en ratones SCID.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Definiciones

[0014] "Anticuerpos nativos" e "inmunoglobulinas nativas" son normalmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por enlace disulfuro covalente, mientras que el número de uniones disulfuro varía entre las cadenas pesadas de isotipos distintos de inmunoglobulinas. Cada cadena ligera y pesada también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido por un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman un punto de contacto entre los dominios variables de cadena ligera y pesada.

- 5 [0015] El término “variable” se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren extensamente en la secuencia entre los anticuerpos y se utilizan en la unión y la especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente entre los dominios variables de los anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos denominados regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) o regiones hipervariables tanto en los dominios variables de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan las regiones de armazón (“framework”) (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan mayoritariamente una configuración en lámina β , conectadas por tres CDRs, que forman bucles de conexión y en algunos casos forman parte de la estructura en lámina β . Las CDRs en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por medio de las regiones FR y, con las CDRs de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., NIH Publ. No. 91-3242, vol. I, páginas 647-669 (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo con el antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente del anticuerpo.
- 10 [0016] La digestión con papaína de los 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 para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento (Fab)₂ que tiene dos sitios de combinación a antígeno y es capaz de unirse de forma cruzada con el antígeno.
- 15 [0017] “Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de una cadena pesada y una cadena ligera en estrecha asociación no covalente. Es en esta configuración que las tres CDRs de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. Colectivamente, las seis CDRs confieren al anticuerpo especificidad de unión a antígeno. Sin embargo, incluso un dominio variable único (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDRs específicas para el antígeno) tiene la capacidad para reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.
- 20 [0018] El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab’ difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi terminal del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab’-SH es la denominación aquí para Fab’ en la que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes contienen un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab’)₂ se produjeron originalmente como parejas de fragmentos Fab’ con una bisagra de cisteínas entre ambos. También son conocidas otras uniones químicas de fragmentos de anticuerpos.
- 25 [0019] Las “cadenas ligeras” de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrados pueden asignarse a uno de los dos tipos claramente distintos, denominados kappa (K) y lambda (λ), según las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.
- 30 [0020] Las inmunoglobulinas pueden agruparse en cinco clases diferentes dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas. Las cinco clases principales de inmunoglobulinas son: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM y algunas de ellas pueden a su vez dividirse en subclases (o isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan respectivamente α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.
- 35 [0021] El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de por lo menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos siempre que muestren actividad biológica deseada.
- 40 [0022] Los “fragmentos de anticuerpo” comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión el antígeno o región variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, Fab’, F(ab’)₂ y los fragmentos Fv; los diacuerpos; los anticuerpos lineales (Zapata et al., Protein Eng., 8(10):1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticuerpos.
- 45 [0023] El término “anticuerpo monoclonal”, tal como se utiliza aquí, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, ya que están dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales), que incluyen
- 50
- 55
- 60

habitualmente anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítomos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales presentan la ventaja de que son sintetizados por el cultivo de hibridomas, no contaminado por otras inmunoglobulinas. El calificativo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo al obtenerse de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que se requiere un procedimiento particular para su producción. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usan de acuerdo con la presente invención pueden obtenerse por el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256:495 [1975], o por procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse, por ejemplo, de bibliotecas de anticuerpos en fagos según las técnicas descritas en Clackson y et al., *Nature*, 352:624-628 [1991] y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991).

[0024] Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen específicamente anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras el resto de la cadena o cadenas es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como los fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 6851-6855 [1984]).

[0025] Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de éstas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂) u otras subsecuencias de unión al antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpos receptores) en los que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor son sustituidos por los residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como de ratón, rata o conejo, con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región armazón (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o armazón importadas. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente y maximizar la acción del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente por lo menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986), Reichmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992). El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo PRIMATIZADO™ en el que la región de unión al antígeno deriva de un anticuerpo producido por inmunización de monos macacos con el antígeno de interés.

[0026] Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena única" o "sFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en los que estos dominios se presentan en una única cadena de polipéptido. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994).

[0027] El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptido (V_H - V_L). Utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más detalladamente en, por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

[0028] Un anticuerpo "aislado" es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que interferirían con las utilidades de diagnóstico y terapéuticas del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteináceos y no proteináceos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de un 95% en peso de anticuerpo según se determina por el método de Lowry, y más preferiblemente más de un 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes ya que por lo menos un componente del medio natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado

se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

[0029] Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza habitualmente por un crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen el cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cérvix, cáncer de ovarios, cáncer hepático, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

[0030] El antígeno “CD20” es una fosfoproteína no glicosilada de 35 kDa hallada en la superficie de más del 90% de las células B de sangre periférica u órganos linfoides. CD20 se expresa durante el desarrollo temprano de pre-células B y permanece hasta la diferenciación de células plasmáticas. CD20 está presente tanto en células B normales como en células B malignas. Otros nombres para CD20 en la literatura incluyen “antígeno limitado a linfocitos B” y “Bp35”. El antígeno CD20 se describe, por ejemplo, en Clark et al. PNAS (USA) 82:1766 (1985).

[0031] “CD40” pretende referirse a la glicoproteína de 50kD expresada en la superficie de células B normales y neoplásicas que actúa como receptor para señales implicadas en la proliferación y la diferenciación celular y algunas veces se refiere como Bp50 (Ledbetter et al., (1987) H, Immunol., 138: 788-795). Se ha aislado un ADNc que codifica CD40 de una biblioteca preparada de a partir de la línea celular Raji del linfoma de Burkitt (Stamenkovic et al., (1989) EMBO J. 8:1403). Una célula que expresa CD40 es cualquier célula que se caracteriza por la expresión en la superficie de CD40, incluyendo, pero sin limitarse, células B normales y neoplásicas, células interdigitantes, células epiteliales basales y células de carcinoma, macrófagos, células endoteliales, células dendríticas foliculares, células de las amígdalas y células plasmáticas derivadas de médula ósea.

[0032] El término “agente citotóxico”, tal como se utiliza aquí, se refiere a una sustancia que detiene el crecimiento, inhibe o previene la función de las células y/o provoca la eliminación de las células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, I^{131} , I^{125} , Y^{90} y Re^{186}), agentes quimioterapéuticos, y toxinas, tales como toxinas activas enzimáticamente derivadas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o fragmentos de los mismos.

[0033] Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen agentes alquilantes, tales como, tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™); sulfonatos de alquilo, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carboquone, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietileno fosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiostatina; mostazas de nitrógeno, tales como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloroetamina, clorhidrato de óxido de mecloroetamina, melfalán, novembiquin, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos, tales como antibióticos de enedina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma11 y caliqueamicina phil1, véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como el cromóforo neocarzinostatina y cromóforos de antibiótico de enedina decromoproteínas relacionadas), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (Adriamicina™), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano, rellenos de ácido fólico, tales como ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una eptilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidamina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricótesenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida: tiotepa; taxoides, por ejemplo

5 paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y doxetaxel (Taxotere®, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucil; gemcitabina (Gemzar™); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina (Navelbina™); novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables. También se incluyen en esta definición agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores, tales como anti-estrógenos y moduladores de receptores de estrógeno selectivos (SERMs), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo Nolvadex™), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (Fareston™); inhibidores de aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógeno en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol (Megace™), exemestano, formestano, fadrozol, vorozol (Rivisor™), letrozol (Femara™), y anastrozol (Arimidex™); y anti-andrógenos, tales como flutamida, nilutamida bicalutamida, leuprolídeo y goserelina; y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.

20 **[0034]** Un “trastorno” es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con la terapia de combinación descrita en la presente invención. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas que incluyen aquellas afecciones patológicas que predisponen el mamífero al trastorno en cuestión. Entre los ejemplos no limitantes de trastornos a tratar en la presente invención se incluyen cáncer, afecciones malignas hematológicas, tumores benignos y malignos; leucemias y afecciones malignas linfoides y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

25 **[0035]** Un agente que “detiene el crecimiento de” o un “agente inhibidor del crecimiento”, cuando se utiliza en la presente invención, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento o proliferación de una célula, especialmente una del tipo de células neoplásicas que expresa el antígeno CD40 o el antígeno CD20 según se requiera. De este modo, el agente inhibidor del crecimiento es aquel que, por ejemplo, reduce significativamente el porcentaje de células neoplásicas en la fase S.

30 **[0036]** El término “infusión intravenosa” se refiere a la introducción de un agente en la vena de un paciente animal o humano durante un periodo de tiempo superior a aproximadamente 15 minutos, en general entre aproximadamente 30 a 90 minutos.

35 **[0037]** El término “bolo intravenoso” o “empuje intravenoso” se refieren a la administración de fármacos en una vena de un animal o humano, de manera que el cuerpo recibe el fármaco en aproximadamente 15 minutos o menos, generalmente 5 minutos o menos.

40 **[0038]** El término “administración subcutánea” se refiere a la introducción de un agente bajo la piel de un paciente animal o humano, preferiblemente en un bolsillo entre la piel y el tejido subyacente, mediante la liberación prolongada relativamente lenta de un receptáculo con fármaco. El bolsillo se puede crear pellizcando o desplazando la piel hacia arriba y hacia fuera del tejido subyacente.

45 **[0039]** “Mamífero” para los objetivos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, animales de zoológico, deportes o de compañía, tales como perros, caballos, gatos y vacas, por nombrar algunos.

50 **[0040]** El término “prospecto” se utiliza para referirse a instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, utilización, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias referentes al uso de dichos productos terapéuticos.

55 **[0041]** El anticuerpo anti-CD20 humanizado referido como el anticuerpo anti-CD20 de la “marca RITUXAN®” es una anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano modificado genéticamente dirigido contra el antígeno CD20. El Rituximab es el anticuerpo denominado “C2B8” en la Patente de Estados Unidos No. 5,736,137, concedida el 7 de abril de 1998. La marca RITUXAN® del anticuerpo C2B8 está indicada para el tratamiento de pacientes con un linfoma no de Hodgkin de células B, positivo de CD20, de grado bajo o folicular recidivante o refractario.

60 **[0042]** El término “infusión subcutánea” se refiere a la introducción de un fármaco bajo la piel de un paciente animal o humano, preferiblemente en un bolsillo entre la piel y el tejido subyacente, mediante una liberación prolongada relativamente lenta de un receptáculo con fármaco durante un periodo de tiempo que incluye, pero sin limitación, 30 minutos o menos, o 90 minutos o menos. Opcionalmente, la infusión se puede realizar mediante implantación subcutánea de una bomba de liberación de fármaco implantada bajo la piel del paciente animal o humano, donde la bomba libera una cantidad predeterminada de fármaco durante un periodo de tiempo predeterminado, tal como 30 minutos, 90 minutos, o un periodo de tiempo que abarca la longitud de la pauta de tratamiento.

[0043] El término “bolo subcutáneo” se refiere a la administración de fármacos por debajo de la piel de un paciente animal o humano, donde la liberación del fármaco en bolo es preferiblemente inferior a aproximadamente 15 minutos, más preferiblemente inferior a 5 minutos, y los más preferible inferior a 60 segundos. La administración se realiza preferiblemente en un bolsillo entre la piel y el tejido subyacente, donde el bolsillo

[0044] El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se utiliza para referirse a una cantidad de un agente activo que tiene un efecto de detención del crecimiento o causa la eliminación de la célula. Preferiblemente, la cantidad terapéuticamente eficaz presenta actividad apoptótica o es capaz de inducir la muerte celular. En aspectos particulares, la cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a una concentración en suero diana que se ha observado que es eficaz en, por ejemplo, la ralentización de la progresión de la enfermedad. La eficacia se puede medir de manera convencional, dependiendo de la afección a tratar. Por ejemplo, en enfermedades o trastornos neoplásicas caracterizados por células que expresan CD40, la eficacia se puede medir mediante la evaluación del tiempo para la progresión de la enfermedad (TTP) o la determinación de la velocidad de respuesta (RR).

[0045] Los términos “tratamiento” y “terapia” y similares tal como se utilizan en el contexto de la presente invención, pretenden incluir medidas terapéuticas, así como profilácticas, o supresoras para una enfermedad o trastorno conduciendo a cualquier efecto clínicamente deseable o beneficioso, incluyendo, pero sin limitarse, al alivio de uno o más síntomas, regresión, ralentización o cese de la progresión de la enfermedad o trastorno. De este modo, por ejemplo, el término tratamiento incluye la administración de un agente antes o después de la aparición de un síntoma de una enfermedad o trastorno, evitando o eliminando así todos los signos de la enfermedad o trastorno. Como otro ejemplo, el término incluye la administración de un agente después de la manifestación clínica de la enfermedad para combatir los síntomas de la enfermedad. Además, la administración de un agente después de la aparición y después del desarrollo de los síntomas clínicos donde la administración afecta a los parámetros clínicos de la enfermedad o el trastorno, tales como el grado de lesión en el tejido o la cantidad o grado de metástasis, tanto si el tratamiento conduce o no a una mejora de la enfermedad, comprende “tratamiento” o “terapia” en el contexto de la invención.

Modos de llevar a cabo la invención

[0046] La presente invención da a conocer composiciones para el tratamiento de una variedad de enfermedades o trastornos caracterizados por células que expresan el antígeno de superficie CD40 mediante la administración de un agente que detiene el crecimiento o causa la eliminación de células que expresan CD40 en combinación con un agente que detiene el crecimiento o causa la eliminación de células que expresan el antígeno CD20, tal como se define en la reivindicación 1 y la reivindicación 3.

[0047] Según la presente invención, un agente que detiene el crecimiento o provoca la eliminación de células que expresan las funciones de CD40 mediante cualquier mecanismo, incluyendo mediante la unión del antígeno de membrana CD40. Por lo tanto, los agentes apropiados, también referidos como “agente específico de CD40”, de la presente invención pueden detener el crecimiento de células o la eliminación de células que expresan CD40 mediante cualquier mecanismo de acción y la presente invención no pretende limitarse por el modo de acción del agente. Por lo tanto, cualquier agente que bloquee la proliferación o en cualquier caso detenga el crecimiento de una célula o provoque su agotamiento, muerte o, en cualquier caso, su eliminación, a través de la unión al antígeno de membrana CD40 es un agente apropiado en el contexto de la presente invención.

[0048] A modo de ejemplo, se sabe que tanto en afecciones malignas de células T como células B, los efectos antitumorales (detención del crecimiento con o sin eliminación apoptosis), tiene lugar a menudo cuando las células malignas se exponen a estímulos que conducen a la activación de linfocitos normales. Esta detención del crecimiento inducida por la activación se ha observado con señales a través de receptores de antígeno o receptores coestimuladores (Ashwell et al., (1987) Science 237:61; Bridges et al., (1987) J. Immunol. 139:4242; Page and Defranco (1988) J. Immunol. 140:3717 y Beckwith et al., (1990) J. Natl. Cancer Inst. 82:501). La estimulación de CD40 por el anticuerpo o ligando soluble inhibe directamente el crecimiento del linfoma de células B (Funakoshi et al., (1994) Blood 83:2787-2794). Los agentes dirigidos contra el antígeno de membrana CD40 y que inhiben el crecimiento de células malignas de esta manera son un ejemplo de agentes apropiados en el contexto de la presente invención.

[0049] Entre los ejemplos específicos se incluyen, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales (mAb) dirigidos contra CD40. Dichos anticuerpos se han descrito (Katira et al., "CD40 Workshop Panel Report" in Leukocyte Typing V, Schlossman et al., (Eds) 1995; 1:547-550). Por ejemplo, se seleccionaron dos mAb, CD40.7 (M2) y CD40.8 (M3), en base a su capacidad de inhibir la unión de CD40 a células que expresan CD40L (Fanslow et al., Leukocyte Typing V, Schlossman et al., (Eds) 1995, 1:555-556). La estimulación de CD40 por mAb M2 y M3 inhibe el crecimiento de varios linfomas de células B e induce la regresión de tumores establecidos in vivo (Funakoshi et al., (1994) Blood 83: 2787-2794; Funakoshi et al., (1996) J. Immunol. 19: 93-101). Las inmunotoxinas de cadena única basadas en mAb G28-5 matan selectivamente células malignas que expresan CD40 in vitro (Francisco et al., (1997) J Biol. Chem. 39: 24165-24169). La publicación internacional número WO 00/75348 describe el uso de formas

recombinantes del anticuerpo S2C6 dirigido por CD40 en el tratamiento de varios trastornos incluyendo el cáncer. Además de liberar una señal estimuladora, el anticuerpo aumenta la interacción entre CD40 y CD40L. La publicación internacional número WO 95/17202 describe el uso de ligandos que se unen a CD40 en la conformación correcta en el tratamiento o prevención de la enfermedad caracterizada por células neoplásicas que expresan CD40.

[0050] Un agente preferido en el contexto de la presente invención es un agente basado en los determinantes de unión del anticuerpo monoclonal S2C6 (Paulie et al., (1984) Cancer Immunol. Immunother. 17: 165-179). Aunque se ha observado que S2C6 tiene una actividad agonista en células B periféricas humanas demostrada por su capacidad de estimular la proliferación de células B primarias de una manera dependiente con la (Paulie et al., (1989) J. Immunol. 142:590-595), se ha observado que los agentes basados en el anticuerpos presentan actividad anti-neoplásica in vivo (Publicación Internacional No. WO 00/75348).

[0051] Los agentes específicos de CD40 incluidos en el alcance de la presente invención incluyen anticuerpos, opcionalmente conjugados con o fusionados a un agente citotóxico. Los agentes específicos de CD40 preferidos son anticuerpos dirigidos contra CD40, tales como los descritos anteriormente, preferiblemente anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos. En aspectos de la presente invención donde el anticuerpo se une al antígeno de superficie CD40 y provoca el agotamiento de los tipos de células que portan CD40, la unión está caracterizada generalmente por ser capaz de guiar el tipo de célula que porta el antígeno CD40 in vivo. Los agentes de unión adecuados se unen al antígeno CD40 con suficiente afinidad y/o avidéz, de manera que el agente específico de CD40 es útil como agente terapéutico para reconocer una célula que expresa el antígeno.

[0052] Según la presente invención, se administra un agente que detiene el crecimiento o provoca la eliminación de células que expresan CD40, en combinación con un agente que detiene el crecimiento o provoca la eliminación de células que expresan CD20. Dicho agente, también referido en la presente invención como "agente específico de CD20" es cualquier molécula que inhibe el crecimiento o destruye o agota las células que expresan CD20 en un mamífero. Los agentes específicos de CD20 apropiados pueden actuar a través de varios mecanismos y la presente invención no pretende limitarse por el mecanismo de acción del agente específico de CD40. Los agentes específicos de CD20 adecuados pueden provocar el agotamiento de células que expresan CD20 a través de mecanismos, tales como citotoxicidad celular mediada por anticuerpo (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), inhibición de proliferación de células B y/o inducción de muerte de células B (por ejemplo, a través de apoptosis).

[0053] Los agentes específicos de CD20 incluidos en el alcance de la presente invención incluyen anticuerpos, opcionalmente conjugados o fusionados a un agente citotóxico. Los agentes específicos de CD20 preferidos son anticuerpos dirigidos contra CD20, preferiblemente anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos. En aspectos de la presente invención en los que el anticuerpo se une al antígeno de superficie CD20 y provoca el agotamiento de los tipos de células que portan CD20, la unión se caracteriza en general por ser capaz de localizarse y guiar al tipo de célula que porta el antígeno CD20 in vivo. Los agentes de unión adecuados se unen al antígeno CD20 con afinidad y/o avidéz suficiente, de manera que el agente específico de CD20 es útil como agente terapéutico para reconocer una célula que expresa el antígeno. Entre los ejemplos de anticuerpos que se unen al antígeno CD20 se incluyen: "C2B8" que se denomina "rituximab" (por ejemplo, la marca "RITUXAN®") (Patente US No. 5, 736,137); el anticuerpo murino 2B8 marcado con ytrio [90] designado como "Y2B8" (Patente US No. 5,736,137); IgG2a murino "B1" opcionalmente marcado con ¹³¹I para generar el anticuerpo "131I-B1" (BEXXAR™) (Patente US No. 5,595,721.); anticuerpo monoclonal murino "1F5" (Press et al. Blood 69 (2):584-591 (1987)); anticuerpo "quimérico 2H7" (Patente US No. 5,677,180); y anticuerpos monoclonales L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 o NU-B2 disponibles del International Leukocyte Typing Workshop (Valentine et al., In: Leukocyte Typing III (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987)).

[0054] Los agentes de la presente invención dirigidos contra los antígenos de superficie CD40 y CD20 se pueden administrar en combinación con otros agentes que detienen el crecimiento. Entre los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento que no se unen al antígeno de membrana CD40 o CD20 se incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto diferente de la fase S), tales como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Los bloqueadores clásicos de la fase M incluyen los vincas (vincristina y vinblastina), TAXOL®, e inhibidores de topo II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Los agentes que detienen G1 también afectan a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Se puede hallar más información en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente pág. 13.

[0055] En una realización preferida, los agentes que detienen el crecimiento, destruyen o provocan la eliminación de células que expresan CD40 y CD20 son anticuerpos. A continuación se proporciona una descripción de técnicas de ejemplo para la producción de los anticuerpos preferidos utilizados según la presente invención.

5 [0056] El antígeno CD40 o CD20 utilizado para la producción de anticuerpos puede ser, por ejemplo, una forma soluble del dominio extracelular de CD40 o CD20 o una parte del mismo, que contiene el epítipo deseado. Alternativamente, las células que expresan CD40 o CD20 en su superficie celular se pueden utilizar para generar anticuerpos. Otras formas de antígeno útiles para generar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la materia.

(i) Anticuerpos policlonales

10 [0057] Los anticuerpos policlonales se desarrollan preferiblemente en animales mediante inyecciones múltiples subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente a una proteína que es inmunogénica en las especies a inmunizar, por ejemplo, la hemocianina de la lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

20 [0058] Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados mediante la combinación de, por ejemplo, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund y la inyección intradérmica de la solución en múltiples sitios. Un mes más tarde, los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a catorce días más tarde los animales sangran y el suero se ensaya para el título de anticuerpo. Los animales se refuerzan hasta que el título se estabiliza. Preferiblemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado a una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también se pueden producir en cultivos de células recombinantes como fusiones de proteínas. Además, los agentes de agregación, tales como el alumbre, se utilizan de forma adecuada para potenciar la respuesta inmune.

(ii) Anticuerpos monoclonales

30 [0059] Los anticuerpos monoclonales se obtienen de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. De este modo, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos.

35 [0060] Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir utilizando el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975) o se pueden producir mediante métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567).

40 [0061] En el método del hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmunizan como se ha descrito anteriormente para conseguir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. A continuación, los linfocitos se fusionan con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Coding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academia Press. 1986)).

45 [0062] Las células de hibridoma preparadas de esta manera se siembran y se desarrollan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo de los hibridomas incluirán habitualmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes de HGPRT.

50 [0063] Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan de manera eficaz, contribuyen a una producción estable a un nivel elevado de anticuerpo por las células productoras de los anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio, tal como medio HAT. Entre éstas, las líneas de células de mieloma preferidas son líneas de mieloma murinas, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, y las células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, Estados Unidos. También se han descrito líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.* 133: 3001 (1984); y Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

60 [0064] Se ensaya el medio de cultivo en el que las células de hibridoma están en crecimiento para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos

monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante la inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA).

5 [0065] La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se pueden determinar, por ejemplo, mediante análisis Scatchard de Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

10 [0066] Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y se pueden desarrollar mediante métodos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academia Press, 1986)). Entre los medios de cultivo adecuados para este objetivo se incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o medio RPM1-1640. Además, las células de hibridoma se pueden desarrollar *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

15 [0067] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de forma adecuada del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

20 [0068] El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped, tales como células *E. coli*, células COS de simios, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de ningún otro modo producen proteína anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Entre los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifican el anticuerpo se incluyen Skerra et al., *Curr. Opinión in Immunol.*, 5:256-262 (1993) y Plückerthun, *Immunol Revs.*, 130:151-188 (1992).

30 [0069] En una realización adicional, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos en fagos generados utilizando las técnicas descritas en McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Las posteriores publicaciones describen la producción de anticuerpos humanos de afinidad elevada (rango de nM) mediante intercambio de cadenas (Marks et al., *Biol. Technology*, 10:779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265-2266 (1993)). De este modo, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas convencionales de hibridomas de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

40 [0070] El ADN también se puede modificar, por ejemplo, mediante la sustitución de la secuencia codificante de los dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; Morrison et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o mediante unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es inmunoglobulina.

45 [0071] Habitualmente, dichos polipéptidos que no son inmunoglobulinas se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo divalente quimérico que comprende un sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

(iii) Anticuerpos humanizados

55 [0072] Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos se han descrito en la técnica. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente como residuos "importados", que habitualmente se sacan de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de secuencias de regiones hipervariables por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de región hipervariable y posiblemente algunos

residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

[0073] La elección de dominios variables humanos, tanto de cadena ligera como pesada, para utilizar en la fabricación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el método denominado “mejor-ajuste”, la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a toda la biblioteca de secuencias de dominios variables humanos conocidos. A continuación, la secuencia humana que está más próxima a la del roedor se acepta como la región armazón (FR) humano para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro método utiliza una región armazón particular derivado de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo armazón se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

[0074] Es también importante que los anticuerpos se humanicen manteniendo una afinidad elevada por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos conceptuales humanizados utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles normalmente y son familiares para los expertos en la materia. Existen programas informáticos disponibles que muestran y visualizan probables estructuras conformaciones tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La observación de estas visualizaciones permite el análisis de la probable función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar del receptor e importar secuencias, de manera que se consigue la característica del anticuerpo deseado, tal como una mayor afinidad por el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión al antígeno.

[0075] Un anticuerpo humanizado de ejemplo de interés de la presente invención se basa en la secuencia de anticuerpo murino S2C6 que reconoce CD40 y se describe en la Publicación Internacional Número WO 00/75348 y comprende residuos determinantes de complementariedad del dominio pesado variable GYSFTGYIH, (SEC ID NO: 1), RVIPNNGGTSYNQKFKG (SEC ID NO:2) y/o EGI---YW (SEC ID NO:3), y opcionalmente comprende modificaciones de aminoácidos de los residuos de CDR, por ejemplo, cuando las modificaciones mantienen esencialmente o mejoran la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante de anticuerpo de interés puede tener de aproximadamente uno a aproximadamente siete o aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en las secuencias de CDR de cadenas pesadas variables anteriores.

[0076] El anticuerpo humanizado puede comprender también residuos determinantes de complementariedad del dominio ligero variable de S2C6 murino. Por lo tanto, se prefieren los residuos de CDR de cadena ligera RSSQSLVHSNGNTFLH (SEC ID NO:4), TVSNRFS (SEC ID NO:5); y SQTTHVPWT (SEC ID NO: 6), por ejemplo, además de los residuos de CDR de dominio pesado variable en el párrafo anterior. Dichos anticuerpos humanizados comprenden opcionalmente modificaciones de aminoácidos de los residuos de CDR anteriores, por ejemplo, cuando las modificaciones mantienen esencialmente o mejoran la afinidad del anticuerpo. Por ejemplo, la variante de anticuerpo de interés puede tener de aproximadamente uno a aproximadamente siete sustituciones de aminoácidos en las secuencias de CDR de cadenas ligeras variables anteriores.

[0077] Se contemplan varias formas del anticuerpo humanizado o el anticuerpo madurado por afinidad. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como una Fab, que está opcionalmente conjugado con uno o más agentes citotóxicos con el fin de generar un inmunoconjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado o anticuerpo madurado por afinidad puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

(iv) Anticuerpos humanos

[0078] Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo ratones) que son capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen la región de unión (J_H) de la cadena pesada del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y en la línea germinal da lugar a la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del grupo de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en estos ratones mutantes en la línea germinal dará lugar a la producción de anticuerpos humanos tras la estimulación con antígenos. Ver, por ejemplo Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2551-255 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362, 255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993); y las Patentes de Estados Unidos 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807.

[0079] Alternativamente, la tecnología de expresión de fagos (McCafferty et al., *Nature* 348, 552-553 [1990]) se

puede utilizar para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos in vitro, a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. Según esta técnica, los genes del dominio V de anticuerpo se clonan en el marco en un gen de proteína de recubrimiento principal o secundario de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se expresan como fragmentos de anticuerpos funcionales sobre la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de cadena única del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan lugar a la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. Así, el fago mimetiza algunas de las propiedades de la célula B. La expresión del fago se puede realizar en una variedad de formatos; para su revisión ver, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3, 564-571 (1993). Se pueden usar varias fuentes de segmentos de genes V para la expresión de fagos. Clackson et al., *Nature* 352, 624-628 (1991) aislaron un conjunto diverso de anticuerpos de anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de bazo de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V a partir de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos en un conjunto diverso de antígenos (incluyendo auto-antígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222, 581-597 (1991), o Griffith et al., *EMBO J.* 12, 725-734 (1993). Véase también las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.565.332 y 5.573.905.

(v) Fragmentos de anticuerpos

[0080] Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Habitualmente, estos fragmentos se derivaban mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan et al., *Science* 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir actualmente directamente mediante células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las bibliotecas de anticuerpos en fagos descritas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E coli* y pueden acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Según otra estrategia, los fragmentos F(Ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el técnico de la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena única (scFv). Véase WO 93/16185; Patente de Estados Unidos No. 5.571.894; y Patente de Estados Unidos No. 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

(vi) Anticuerpos biespecíficos

[0081] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tiene especificidades de unión con por lo menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos de ejemplo se pueden unir a dos epítopos diferentes de CD40 o CD20. Otros de dichos anticuerpos se pueden combinar con un sitio de unión a CD40 con el sitio o sitios de unión o CD20 u otro marcador de células malignas. Alternativamente, un brazo anti-CD20 o anti-CD40 puede combinarse con un brazo que se une a una molécula inductora en un leucocito, tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, CD2 o CD3) o receptores Fc para IgG (FC_γR), tales como FC_γRI (CD64), FC_γRII (CD32) y FC_γRIII (CD16) con el fin de centrar los mecanismos de defensa celulares en la célula que expresa CD40 o CD20. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos en células que expresan CD40 o CD20. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a CD20 o CD40 y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón- α , alcaloide vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno con isótopo radioactivo). Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

[0082] Los procedimientos para realizar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción habitual de anticuerpos específicos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Milstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante incómoda y los rendimientos de producto son bajos. En WO 93/08829 y en Truanecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991) se describen procesos similares.

[0083] Según una estrategia diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión se produce preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere que la primera región constante de cadena pesada (CH1) contenga el sitio necesario para la unión a cadena ligera, presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en

un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones cuando las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido utilizadas en la construcción proporcionan rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión cuando la expresión de por lo menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da lugar a rendimientos elevados o cuando las proporciones no tienen particular importancia.

[0084] En una realización preferida de esta estrategia, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se observó que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado a partir de combinaciones de cadenas de inmunoglobulinas no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una vía sencilla de separación. Esta estrategia se describe en WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986).

[0085] Según otra estrategia descrita en la Patente de Estados Unidos No. 5.731.168, la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpos se puede diseñar para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de cultivos de células recombinantes. La interfase preferida comprende por lo menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes se crean en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de cadenas laterales de aminoácidos grandes por pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

[0086] Entre los anticuerpos biespecíficos se incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, y el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de Estados Unidos No. 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden fabricar utilizando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen en la Patente de Estados Unidos No. 4.676.980 junto con un grupo de técnicas de reticulación.

[0087] Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la literatura. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos utilizando enlaces químicos. Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se separan proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar los ditiolos vecinales y evitar la formación de enlaces disulfuro intermoleculares. A continuación, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte a continuación en Fab'-tiol mediante la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

[0088] Se han descrito también varias técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y, a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha descrito otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante la utilización de dímeros de Fv de cadena única (sFv). Véase Gruber et al., *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

[0089] Se consideran los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991).

5 [0090] Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, para aumentar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede conseguir mediante la introducción de una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativamente o adicionalmente, el residuo o residuos de cisteína se pueden introducir en la región Fc, permitiendo así la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una mayor citólisis mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Véase Caron et al., J. Exp. Med. 176: 1191-195 (1992) y Schopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con mayor actividad antitumoral también se pueden preparar utilizando reticuladores heterobifuncionales tal como se describe en Wolff et al. Cancer Research 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, se puede diseñar un anticuerpo que tenga regiones Fc duales y puede tener por tanto una mayor capacidad de lisis de complemento y ADCC. Véase Stevenson et al. anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989).

15 [0091] Para incrementar la vida media del anticuerpo en el suero, se puede incorporar un epítipo de unión a receptor salvaje en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) tal como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.739.277, por ejemplo. Tal como se utiliza aquí, el término "epítipo de unión a receptor salvaje" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable del incremento en la vida media de la molécula IgG en el suero *in vivo*.

20 [0092] Para identificar anticuerpos en el contexto de la presente invención dirigidos contra CD40 o CD²⁰, tales como anticuerpos inhibidores del crecimiento, se pueden cribar anticuerpos que inhiben el crecimiento de células cancerosas que expresan CD40 o CD20, tales como las líneas de células descritas en las secciones de Ejemplo de la presente invención.

25 Enfermedad o trastorno

[0093] La presente invención proporciona una composición para el tratamiento de varias enfermedades o trastornos caracterizados por células que expresan CD40, especialmente aquellos en los que se consigue cualquier efecto clínicamente deseable o beneficioso, tales como la regresión, ralentización o cese de la progresión de la enfermedad o trastorno, mediante la detención del crecimiento o eliminación de células que expresan CD40. Dichas enfermedades o trastornos incluyen enfermedades o trastornos neoplásicos, que incluyen, pero sin limitación, tumores benignos y malignos, incluyendo aquellos de origen epitelial, tales como un carcinoma, origen mesodérmico, tales como un sarcoma y afecciones malignas hematológicas, incluyendo leucemias, linfomas y mielomas.

35 [0094] La enfermedad o trastorno de la presente invención está tipificado por células que expresan el antígeno de superficie CD40 y células que expresan el antígeno de superficie CD20. En el escenario habitual, el tipo de célula que expresa el antígeno de superficie CD40 expresa también el antígeno de superficie CD20, aunque esto no es necesario. Por ejemplo, una enfermedad o trastorno caracterizados por células que expresan CD40 se pueden tipificar también por células que expresan el antígeno de superficie CD20 y estas células pueden ser las mismas células o células diferentes. Dado que la expresión del antígeno de superficie CD40 precede a la expresión del antígeno CD20 en el desarrollo de un subgrupo de los tipos de células que expresan CD40, expresará también CD20. Por otro lado, las células que expresan CD20 habitualmente también expresarán CD40. Por lo tanto, una enfermedad o trastornos preferidos caracterizados por células que expresan el antígeno de superficie CD40 son cualquier enfermedad o trastorno caracterizados por células que expresan el antígeno de superficie CD20.

[0095] Dichas enfermedades o trastornos incluyen varias enfermedades o trastornos neoplásicos, incluyendo afecciones malignas de células B. Ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos neoplásicos incluyen los indicados en la Tabla I.

50 Tabla I

I. Tumores hematológicos

A. Leucemia

55 leucemia aguda
leucemia linfocítica aguda
leucemia mielocítica aguda
mieloblástica
promielocítica
mielomonocítico
monocítico
60 eritroleucemia
leucemia crónica
crónica mielocítica
leucemia (granulocítica)
leucemia infocítica crónica

	B. Policitemia vera
	C. Linfoma
	enfermedad de Hodgkin
	enfermedad no de Hodgkin
5	D. Mieloma múltiple
	E. Macroglobulinemia de Waldenström
	F. Enfermedad de cadena pesada
	II. Tumores sólidos
10	A. Sarcomas y carcinomas
	fibrosarcoma
	mixosarcoma
	liposarcoma
	condrosarcoma
15	sarcoma osteogénico
	osteosarcoma
	cordoma
	angiosarcoma
	endoteliosarcoma
20	linfangiosarcoma
	linfangioendoteliosarcoma
	sinovioma
	mesotelioma
	tumor de Ewing
25	leiomiomasarcoma
	rabdomiosarcoma
	carcinoma de colon
	carcinoma colorrectal
	cáncer pancreático
30	cáncer de mama
	cáncer de ovario
	cáncer de próstata
	carcinoma de células escamosas
	carcinoma de células basales
35	adenocarcinoma
	carcinoma de glándulas sudoríparas
	carcinoma de glándulas sebáceas
	carcinoma papilar
	adenocarcinoma papilar
40	cistadenocarcinoma
	carcinoma medular
	carcinoma broncogénico
	carcinoma de células renales
	hepatoma
45	carcinoma de conductos biliares
	coriocarcinoma
	seminoma
	carcinoma embrionario
	tumor de Wilm
50	cáncer cervical
	cáncer uterino
	tumor testicular
	carcinoma de pulmón
	carcinoma de pulmón de célula pequeña
55	carcinoma de pulmón de célula no pequeña
	carcinoma de vejiga
	carcinoma epitelial
	glioma
	astrocitoma
60	meduloblastoma
	craniofaringioma
	ependimoma
	pinealoma
	hemangioblastoma
	neuroma acústico

oligodendroglioma
menangioma
melanoma
neuroblastoma

5 retinoblastoma
carcinoma nasofaríngeo
carcinoma de esófago.

10 **[0096]** Otra clase de enfermedades o trastornos tratables en el contexto de la presente invención son enfermedades o trastornos de etiología autoinmune, tales como los que afectan a un tejido u órgano del cuerpo, incluyendo piel, pericardio cardiaco, endocardio, vasculatura, un complemento sanguíneo (por ejemplo, eritrocitos, plaquetas), tejido formador de sangre (por ejemplo, médula, bazo), tejido u órganos endocrinos (por ejemplo, páncreas, tiroides), tracto gastrointestinal (por ejemplo, intestino), tracto respiratorio (por ejemplo, pulmón), riñón, sistema nervioso central, sistema nervioso periférico, articulaciones musculares y esqueléticas. De este modo, la presente invención se puede llevar a cabo en un sujeto con los síntomas, manifestaciones o factores de riesgo para dermatitis atópica, cualquier forma de lupus (incluyendo lupus cutáneo (lupus eritematoso discorde) y cualquier tipo de lupus extracutáneos, incluyendo lupus eritematoso sistémico, lupus agudo, lupus annularis, lupus discreto, lupus linfático, lupus papulomatoso, lupus psoriasis, lupus vulgaris, lupus esclerosis, lupus eritematoso neonatal y lupus inducido por fármacos), síndrome antifosfolípidos, anemia hemolítica, trombocitopenia idiopática, tiroiditis, diabetes mellitus, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, rinitis, miastenia gravis, artritis reumatoide y enfermedades desmielinizantes, tales como esclerosis múltiple.

Conjugados y otras modificaciones de los agentes

25 **[0097]** Los agentes utilizados en los métodos o incluidos en los artículos de fabricación de la presente invención están opcionalmente conjugados con un agente citotóxico. Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos conjugados agente-agente citotóxico se han descrito anteriormente. También se contemplan en la presente invención conjugados de un agente y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como una caliqueamicina, una maitansina (Patente de Estados Unidos No. 5.208.020), un tricoteno, y CC1065. En una realización de la presente invención, el agente se conjuga a una o más moléculas de maitansina (por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 moléculas de maitansina por molécula de agente). La maitansina se puede convertir, por ejemplo, en May-SS-Me que se puede reducir a May-SH3 y reaccionar con el agente modificado (Cari et al., Cancer Research 52: 127-131 [1992]) para generar un conjugado maitansinoide-agente.

35 **[0098]** Alternativamente, el agente se conjuga a una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de caliqueamicina es capaz de producir roturas del ADN de doble cadena en concentraciones subpicomolares. Entre los análogos estructurales de caliqueamicina que se pueden utilizar se incluyen, pero sin limitación, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1^1 (Hinman et al., Cancer Research 53: 3336-3342 [1993] y LODÉ et al. Cancer Research 58: 2925-2928 [1998]).

40 **[0099]** Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar se incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAPS), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, WO 93/21232 publicada el 28 de octubre de 1993.

50 **[0100]** La presente invención se refiere además a un agente conjugado con un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa, tal como una desoxribonucleasa; ADNasa).

[0101] Existe un conjunto de isótopos radioactivos disponibles para la producción de agentes radioconjugados adecuados en el contexto de la presente invención. Algunos ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radioactivos de Lu.

55 **[0102]** Los conjugados de un agente y el agente citotóxico se pueden fabricar utilizando un conjunto de agentes bifuncionales acopladores de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal y como se describe en Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietil triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionúcleos al anticuerpo. Véase WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador separable" que facilita la

liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador lábil en ácido, un enlazador sensible a peptidasa, un enlazador dimetilo o un enlazador que contiene disulfuro (Cari et al. Cancer Research 52: 127-131 [1992]).

5 **[0103]** Alternativamente, se puede fabricar una proteína de fusión que comprende el agente y el agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos.

10 **[0104]** Se pueden utilizar inmunotoxinas de cadena única. Las inmunotoxinas de cadena única son moléculas bifuncionales que consisten en un dominio de unión a anticuerpo fusionado a una toxina de proteína. Una vez unidas a las células diana, las inmunotoxinas se internalizan en las vesículas endocíticas donde la parte catalítica de la toxina se procesa y libera al citosol. Una vez en el citosol, las proteínas sintasas se detienen y sigue la muerte celular.

Formulaciones

15 **[0105]** Las formulaciones de los agentes activos en el contexto de la presente invención variarán y dependerán de varios factores conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, la vía de administración y el agente activo, que es un anticuerpo. El experto en la materia reconocerá que los anticuerpos utilizados según la presente invención se pueden preparar para el almacenamiento y la administración posterior mediante la combinación de un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16^a Edición, Osol, A. Ed. (1980)), a menudo en forma de polvos liofilizados o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes adecuados son no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como, cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabens, tales como metil o propil paraben; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

35 **[0106]** Los principios activos también pueden estar contenidos en microcápsulas, microcápsulas, en sistemas de liberación de fármacos coloidales, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas, o en macroemulsiones. Se pueden preparar preparaciones de liberación controlada según procedimientos conocidos en la técnica. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación controlada se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación controlada se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos, copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como el LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros, tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante mucho tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, dando lugar a la pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede conseguir modificando residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, utilizando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

Tratamiento

55 **[0107]** Se contempla que los agentes que incluyen anticuerpos de la presente invención se administran a un sujeto con necesidad del mismo, de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, mediante vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o por inhalación. Se prefiere administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo. Habitualmente, las dosis de mantenimiento se liberan mediante administración con bolo, preferiblemente mediante administración subcutánea de bolo, haciendo el tratamiento conveniente y rendible para el paciente y profesionales de la salud. El agente específico de CD40 y el agente específico de CD20 se pueden administrar simultáneamente o por separado, un agente específico sigue al otro.

5 [0108] Cuando se desea la administración combinada de un agente quimioterapéutico, la administración combinada incluye la coadministración, utilizando formulaciones separadas, y la administración consecutiva en cualquier orden, en el que preferiblemente existe un periodo de tiempo en el que ambos (o todos) agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. La preparación y pautas de dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos se pueden utilizar según las instrucciones del fabricante o se determinan empíricamente por el médico. La preparación y pautas de dosificación para dicha quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). El agente quimioterapéutico puede preceder o seguir a la administración del anticuerpo o se puede administrar simultáneamente con el mismo. En WO98/56418 se describen ejemplos de formulaciones de anticuerpos. Esta publicación describe una formulación multidosis líquida que comprende 40 mg/mL de rituximab, 25 mM de acetato, 150 mM de trehalosa, alcohol bencílico al 0,9%, polisorbato 20 al 0,02% a pH 5,0 que tiene una vida de almacenamiento de dos años a 2-8°C. Otra formulación anti-CD20 de interés comprende 10mg/mL de rituximab en cloruro sódico 9,0 mg/mL, 7,35 mg/mL de citrato sódico dihidratado, 0,7 mg/mL de polisorbato 80, y Agua estéril para inyección, pH 6,5.

15 [0109] Puede ser deseable también administrar anticuerpos contra otros antígenos asociados a tumores, tales como anticuerpos que se unen al EGFR, ErbB3, ErbB4, o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Alternativamente, o adicionalmente, se pueden coadministrar al paciente dos o más anticuerpos anti-CD40. Algunas veces, puede ser beneficioso también administrar una o más citoquinas al paciente. El anticuerpo se puede coadministrar con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento se puede administrar en primer lugar, seguido del agente activo, tal como un anticuerpo. Sin embargo, también se contempla la administración simultánea o la administración del anticuerpo en primer lugar. Las dosis adecuadas para el agente inhibidor del crecimiento son las utilizadas actualmente y se pueden disminuir debido a la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y el agente activo.

20 [0110] Además de las pautas terapéuticas anteriores, el paciente puede someterse a la extracción quirúrgica de células cancerosas y/o terapia de radiación

25 [0111] Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada del agente, incluyendo anticuerpos, dependerá del tipo de enfermedad a tratar, tal como se ha definido anteriormente, la gravedad y evolución de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio el médico asistente. El anticuerpo se administra de manera adecuada al paciente en una vez o durante una serie de tratamientos. Cuando el tratamiento implica una serie de tratamientos, la dosis inicial o las dosis iniciales se siguen a intervalos diarios o semanales mediante dosis de mantenimiento. Cada dosis de mantenimiento proporciona la misma cantidad o una cantidad más pequeña de anticuerpo en comparación con la cantidad de anticuerpo administrada en la dosis o las dosis iniciales.

30 [0112] Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de anticuerpo es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica podría variar desde aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se mantiene hasta que tenga lugar la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

45 Artículos de fabricación

50 [0113] En otra realización de la presente invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un envase, una etiqueta y un prospecto. Entre los envases adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los envases pueden estar formados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que es eficaz para el tratamiento de la condición y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón agujereable por una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo en la composición es un anticuerpo anti-CD40. La etiqueta en, o asociada con, el envase indica que la composición se utiliza para tratar la condición de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Se puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

60 [0114] Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no a modo de limitación.

EJEMPLOS**EJEMPLO I**

5 Materiales y métodos

Animales

10 **[0115]** Se obtuvieron ratones hembra CB-17 IcrTac-scidfDF (8-9 semanas de vida) de Taconic (Germantown, NY 12526).

Líneas de células tumorales

15 **[0116]** Se adquirieron de la American Type Culture Collection (Manassas, VA 20110) líneas celulares del linfoma de Burkitt negativo de EBV Ramos, plasmacitoma positivo de EBV HS Sultan y mieloma múltiple positivo de EBV IM9. La línea celular de linfoma de Ramos resistente a Rituxan se estableció a través de la exposición de la línea celular del linfoma de Ramos a dosis elevadas de Rituxan (500 µg/ratón IP, 3 veces/semana durante 3 semanas) en un ratón scid por xenoinjerto subcutáneo.

20 Modelo de diseminación tumoral

25 **[0117]** Los ratones se inyectaron a través de la vena de la cola con 1×10^6 células tumorales en 100 µl de HBSS. El tratamiento con anticuerpo de control o SGN-14 o Rituxan o la combinación de Rituxan y SGN-14 o mAb SGN-14 quimérico o mAb SGN-14 quimérico y Rituxan o mAb anti-CD40 humano se inició en el día 3 después de la inoculación del tumor. Los anticuerpos se administraron intraperitonealmente 100 µg por ratón en 100 µl de solución salina estéril a la frecuencia de 3 veces por semana durante un total de 3 semanas de tratamiento. Se controló la mortalidad de los ratones dos veces diarias. La causa de la muerte se confirmó mediante evaluación histopatológica.

30 Modelo de tumor subcutáneo

35 **[0118]** Los ratones se inyectaron subcutáneamente en el flanco derecho con 5×10^6 células tumorales en 100 µl de HBSS. El tratamiento empezó cuando el volumen tumoral alcanzaba ~150 mm³ cúbicos con el anticuerpo de control o SGN-14 o Rituxan o la combinación de SGN-14 y Rituxan o mAb SGN-14 quimérico o mAb SGN-14 quimérico y Rituxan o mAb anti-CD40 humano. Cada ratón recibió 100 µg de uno de los anticuerpos en 100 µl de solución salina estéril intraperitonealmente 3 veces por semana durante un total de 3 semanas de tratamiento. El volumen tumoral se midió semanalmente.

Resultados

40 **[0119]** Se realizó la comparación de la actividad antitumoral de un anticuerpo anti-CD40 humanizado basado en los CDR murino de S2C6 (Publicación Internacional No. WO 00/75348) y un anticuerpo anti-CD20 (producto de marca RITUXAN®) contra el linfoma de Ramos transplantado en ratones SCID. Los resultados se presentan en la figura 1. A los 21 días después del tratamiento, se redujo significativamente el volumen del tumor en comparación con el control en animales que recibieron anticuerpo anti-CD40 humanizado y en animales que recibieron anticuerpo anti-CD20.

50 **[0120]** Se realizó la comparación de la actividad antitumoral de un anticuerpo anti-CD40 murino (S2C6 (SGN14) Publicación Internacional No. WO 00/75348) y un anticuerpo anti-CD20 (producto de marca RITUXAN®) contra el linfoma de Ramos transplantado en ratones SCID. Los resultados se presentan en la figura 2. A los 31 días después del tratamiento, se redujo significativamente el volumen del tumor en animales que recibieron anticuerpo anti-CD40 en comparación con el control, así como con animales que recibieron anticuerpo anti-CD20.

55 **[0121]** Se evaluó en ratones SCID transplantados la actividad antitumoral de un anticuerpo anti-CD20 (producto de marca RITUXAN®) y un anticuerpo anti-CD40 humanizado (basado en los CDR de S2C6 murino (SGN-14) Publicación Internacional No. WO 00/75348) contra IM9 (mieloma múltiple CD20+, CD40+). Los resultados se presentan en la figura 3. La supervivencia después del implante se extendió en animales que recibieron anticuerpo anti-CD40 en comparación con el control y animales que recibieron anticuerpo anti-CD20.

60 **[0122]** Se evaluó la actividad antitumoral contra H.S. Sultan (Mieloma Múltiple CD20+, CD40+) transplantado en ratones SCID en la combinación de un anticuerpo anti-CD20 (producto de marca RITUXAN®) y un anticuerpo anti-CD40 murino (S2C6 (SGN14) Publicación Internacional No. WO 00/75348). Los resultados se presentan en la figura 4. La supervivencia se extendió en ratones que recibieron una combinación de anticuerpo anti-CD40 y anticuerpo anti-CD20 en comparación con los animales de control y animales que recibieron anticuerpo anti-CD40 o anticuerpo anti-CD20 solos.

5 [0123] Se evaluó la actividad antitumoral de un anticuerpo anti-CD40 murino (S2C6 (SGN14) Publicación Internacional No. WO 00/75348) y un anticuerpo anti-CD20 (producto de marca RITUXAN®) sobre el linfoma de Ramos resistente a la marca RITUXAN® en ratones SCID transplantados. Los resultados se presentan en la figura 5. El volumen tumoral en ratones que recibieron una combinación de anticuerpo anti-CD40 y un anticuerpo anti-CD20 se redujo significativamente en comparación con cada uno de los animales de control y animales que recibieron anticuerpo anti-CD20 o anti-CD40 solos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que consiste en un anticuerpo dirigido contra CD40, más opcionalmente portadores farmacéuticamente aceptables, excipientes farmacéuticos o estabilizadores farmacéuticos, en la que el anticuerpo detiene el crecimiento o provoca la eliminación de células que expresan CD40 y está opcionalmente conjugado con un isótopo radioactivo, un agente quimioterapéutico, toxina o fragmentos de los mismos, para utilizar en el tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizados por células que expresan CD40 en un mamífero, en la que el tratamiento comprende la administración de dicha composición en combinación con una segunda composición, en la que la segunda composición consiste en un anticuerpo dirigido contra CD20 más
- 10 opcionalmente portadores farmacéuticamente aceptables, excipientes farmacéuticos o estabilizadores farmacéuticos y en la que el anticuerpo dirigido contra CD20 detiene el crecimiento o provoca la eliminación de células que expresan CD20 y está opcionalmente conjugado con un isótopo radioactivo, agente quimioterapéutico, toxina o fragmentos de los mismos.
- 15 2. Utilización de un anticuerpo dirigido contra CD40, en la que el anticuerpo detiene el crecimiento o provoca la eliminación de células que expresan CD40, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizados por células que expresan CD40 en un mamífero, en la que el medicamento consiste en el anticuerpo dirigido contra CD40 opcionalmente conjugado a un isótopo radioactivo, agente quimioterapéutico, toxina o fragmentos de los mismos, y opcionalmente portadores farmacéuticamente
- 20 aceptables, excipientes farmacéuticos o estabilizadores farmacéuticos y en la que el tratamiento comprende la administración del medicamento en combinación con una composición que consiste en un anticuerpo dirigido contra CD20, opcionalmente conjugado a un isótopo radioactivo, agente quimioterapéutico, toxina o fragmentos de los mismos, y opcionalmente portadores farmacéuticamente aceptables, excipientes farmacéuticos o estabilizadores farmacéuticos, en la que el anticuerpo dirigido contra CD20 detiene el crecimiento o provoca la eliminación de células que expresan CD20.
- 25 3. Composición que consiste en un anticuerpo dirigido contra CD20 más opcionalmente portadores farmacéuticamente aceptables, excipientes farmacéuticos o estabilizadores farmacéuticos, en la que el anticuerpo detiene el crecimiento o provoca la eliminación de células que expresan CD20 y está opcionalmente conjugado a un
- 30 isótopo radioactivo, agente quimioterapéutico, toxina o fragmentos de los mismos, para utilizar en el tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizados por células que expresan CD40 en un mamífero, en la que el tratamiento comprende la administración de dicha composición en combinación con una segunda composición, en la que la segunda composición consiste en un anticuerpo dirigido contra CD40 más
- 35 opcionalmente portadores farmacéuticamente aceptables, excipientes farmacéuticos o estabilizadores farmacéuticos, en la que el anticuerpo dirigido contra CD40 detiene el crecimiento o provoca la eliminación de células que expresan CD40 y está opcionalmente conjugado con un isótopo radioactivo, agente quimioterapéutico, toxina o fragmentos de los mismos.
- 40 4. Utilización de un anticuerpo dirigido contra CD20, en la que el anticuerpo detiene el crecimiento o provoca la eliminación de células que expresan CD20, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizados por células que expresan CD40 en un mamífero, en la que el medicamento consiste en el anticuerpo dirigido contra CD20 opcionalmente conjugado a un isótopo radioactivo, agente quimioterapéutico, toxina o fragmentos de los mismos, y opcionalmente portadores farmacéuticamente
- 45 aceptables, excipientes farmacéuticos o estabilizadores farmacéuticos y en la que el tratamiento comprende la administración del medicamento en combinación con una composición que consiste en un anticuerpo dirigido contra CD40, y opcionalmente portadores farmacéuticamente aceptables, excipientes farmacéuticos o estabilizadores farmacéuticos, en la que el anticuerpo dirigido contra CD40 detiene el crecimiento o provoca la eliminación de células que expresan CD40 y está opcionalmente conjugado con un isótopo radioactivo, agente quimioterapéutico, toxina o fragmentos de los mismos.
- 50 5. Composición o utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en las que el tratamiento comprende administrar el anticuerpo dirigido contra CD20 y el anticuerpo dirigido contra CD40 por separado, uno después del otro.
- 55 6. Composición o utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en las que la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno neoplásicos.
- 60 7. Composición para utilizar o utilización según la reivindicación 6, en las que el tratamiento comprende además la administración de uno o más agentes quimioterapéuticos en una formulación o formulaciones separadas.
8. Composición para utilizar o utilización según la reivindicación 7, en las que el tratamiento comprende la administración simultánea del agente quimioterapéutico con el anticuerpo dirigido contra CD40 y/o el anticuerpo dirigido contra CD20.

9. Composición para utilizar o utilización según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en las que el agente o los agentes quimioterapéuticos comprenden gemcitabina.
- 5 10. Composición para utilizar según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en la que el agente o los agentes quimioterapéuticos comprenden ifosfamida, carboplatino y etopósido.
11. Composición para utilizar o utilización según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en las que la enfermedad o trastornos neoplásicos es una afección maligna hematológica.
- 10 12. Composición para utilizar o utilización según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en las que la enfermedad o trastornos neoplásicos es un tumor sólido.
13. Composición para utilizar o utilización según la reivindicación 11, en las que la afección maligna es un linfoma.
- 15 14. Composición para utilizar o utilización según la reivindicación 13, en las que el linfoma es un linfoma de tipo no de Hodgkin.
15. Composición para utilizar o utilización según la reivindicación 11, en las que la afección maligna es un mieloma.
- 20 16. Composición para utilizar o utilización según la reivindicación 15, en las que el mieloma es un mieloma múltiple.
17. Composición para utilizar o utilización según la reivindicación 11, en las que la afección maligna es una leucemia.
- 25 18. Composición para utilizar o utilización según la reivindicación 17, en las que la leucemia es leucemia linfocítica crónica.
19. Composición para utilizar o utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en las que la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno autoinmunes.
- 30 20. Composición para utilizar o utilización según la reivindicación 19, en las que la enfermedad autoinmune es artritis reumatoide.
- 35 21. Composición para utilizar o utilización según la reivindicación 19, en las que la enfermedad autoinmune es lupus eritematoso sistémico.
22. Composición para utilizar o utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en las que el anticuerpo dirigido contra CD40 es un anticuerpo monoclonal.
- 40 23. Composición para utilizar o utilización según la reivindicación 22, en las que el anticuerpo monoclonal dirigido contra CD40 es un anticuerpo quimérico.
24. Composición para utilizar o utilización según la reivindicación 23, en las que el anticuerpo dirigido contra CD40 es un anticuerpo humanizado.
- 45 25. Composición para utilizar o utilización según la reivindicación 22, en las que el anticuerpo dirigido contra CD40 compite por la de unión de CD40 con el anticuerpo monoclonal S2C6.
- 50 26. Composición para utilizar o utilización según la reivindicación 22, en las que el anticuerpo dirigido contra CD40 presenta las características de unión del anticuerpo monoclonal S2C6.
27. Composición para utilizar o utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en las que el anticuerpo dirigido contra CD20 es un anticuerpo monoclonal.
- 55 28. Composición para utilizar o utilización según la reivindicación 27, en las que el anticuerpo monoclonal dirigido contra CD20 es un anticuerpo quimérico.
- 60 29. Composición para utilizar o utilización según la reivindicación 28, en las que el anticuerpo monoclonal dirigido contra CD20 es C2B8.

Comparación de la actividad antitumoral de un anticuerpo anti-CD40 humanizado y un anticuerpo anti-CD20 humanizado contra el linfoma de Ramos transplantado en ratones SCID

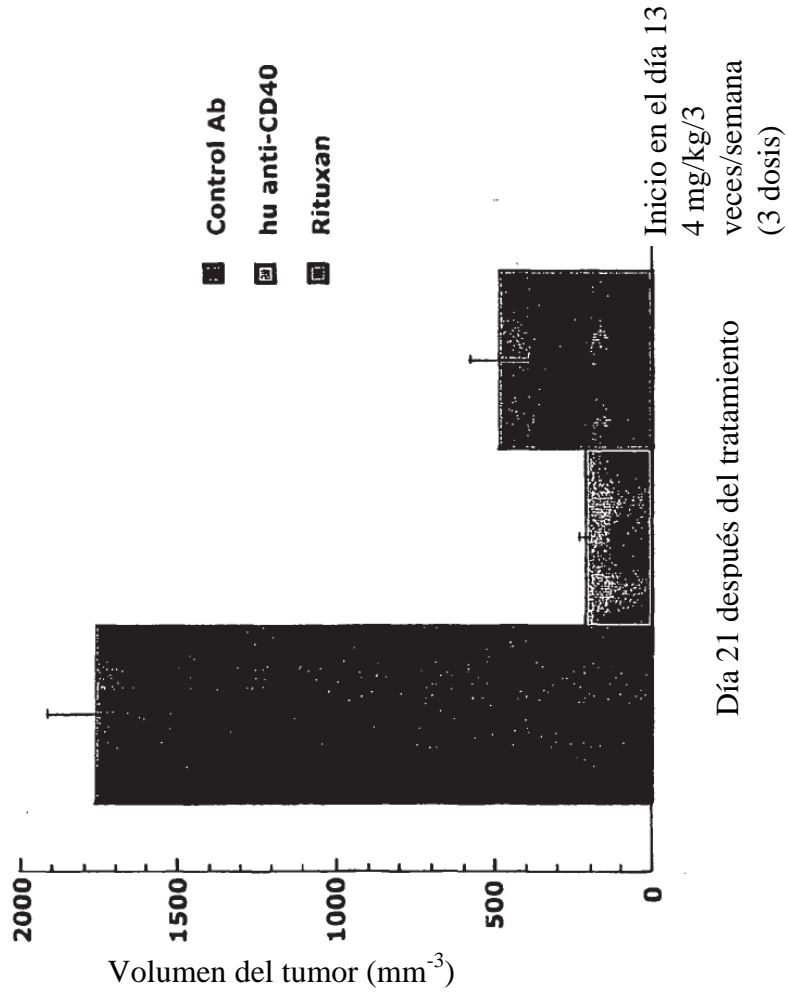


Fig. 1

00-462
001110

Comparación de la actividad antitumoral de un anticuerpo anti-CD40 murino (SGN-14) y un anticuerpo anti-CD20 humanizado contra el linfoma de Ramos transplantado en ratones SCID

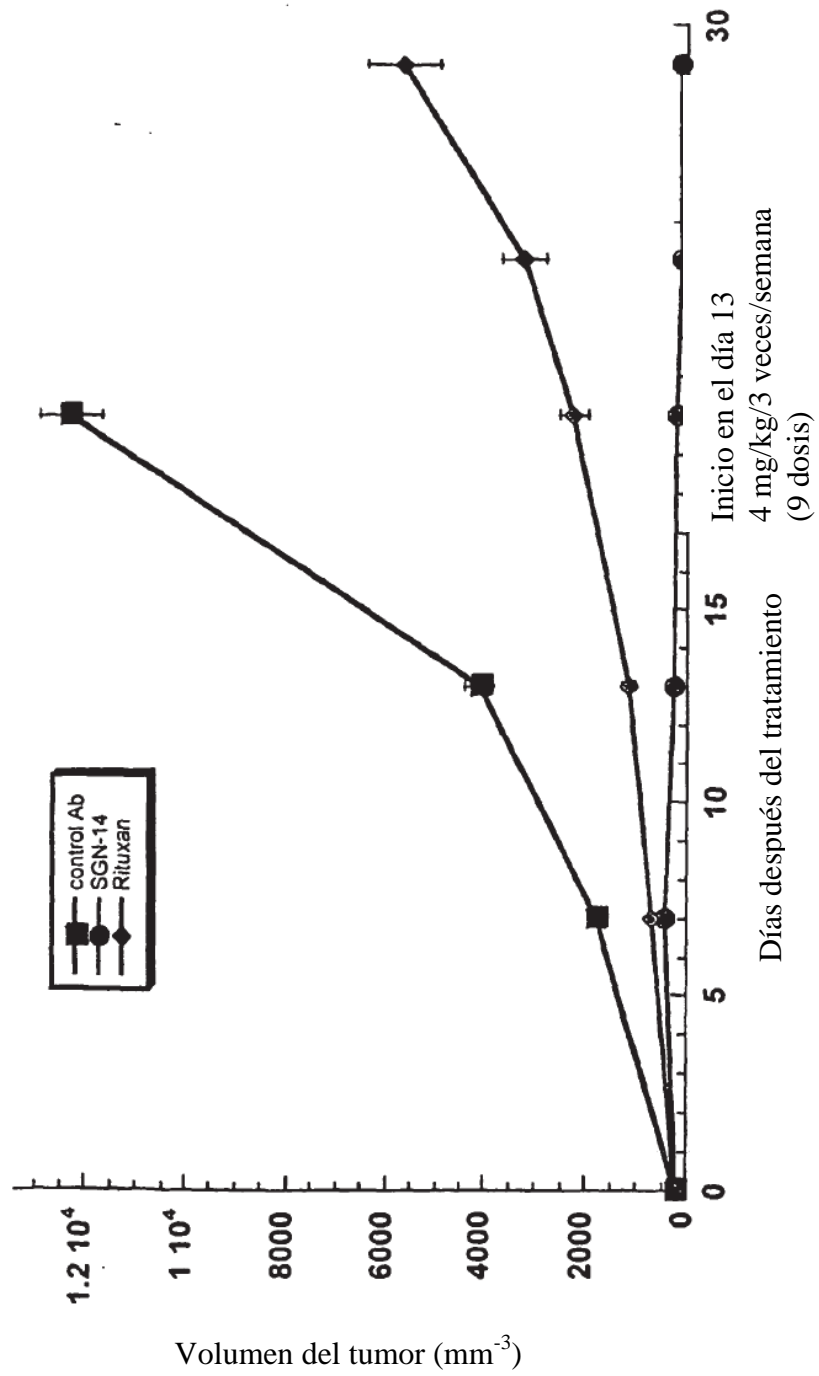
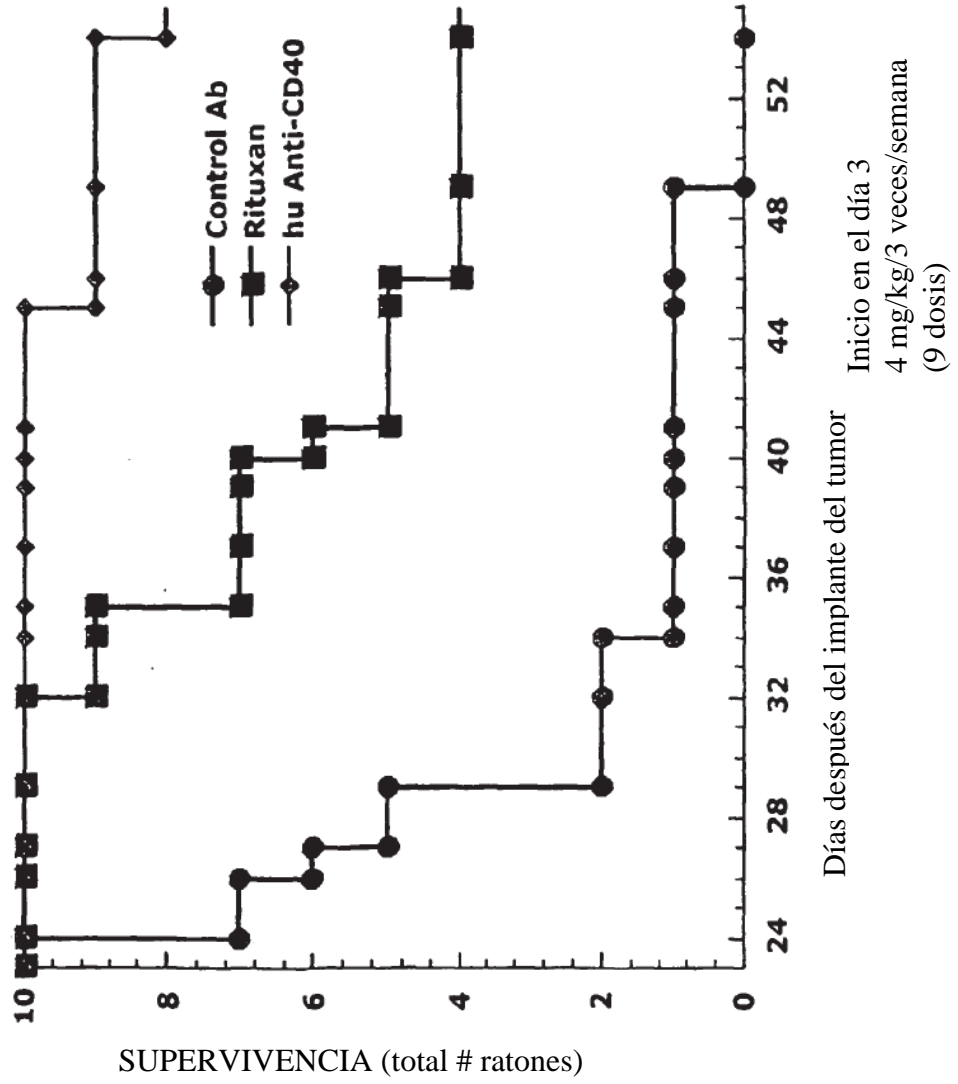


Fig. 2

00-1116
000329

Actividad antitumoral de un anticuerpo anti-CD20 humanizado y un anticuerpo anti-CD40 humanizado contra IM9 (Mieloma múltiple CD20+, CD40+) transplantado en ratones SCID



00-529
110300

Fig. 3

Combinación de un anticuerpo anti-CD20 humanizado y un anticuerpo anti-CD40 murino (SGN-14) para la actividad antitumoral contra H.S. Sultan (Mieloma múltiple CD20+, CD40+) trasplantado en ratones SCID

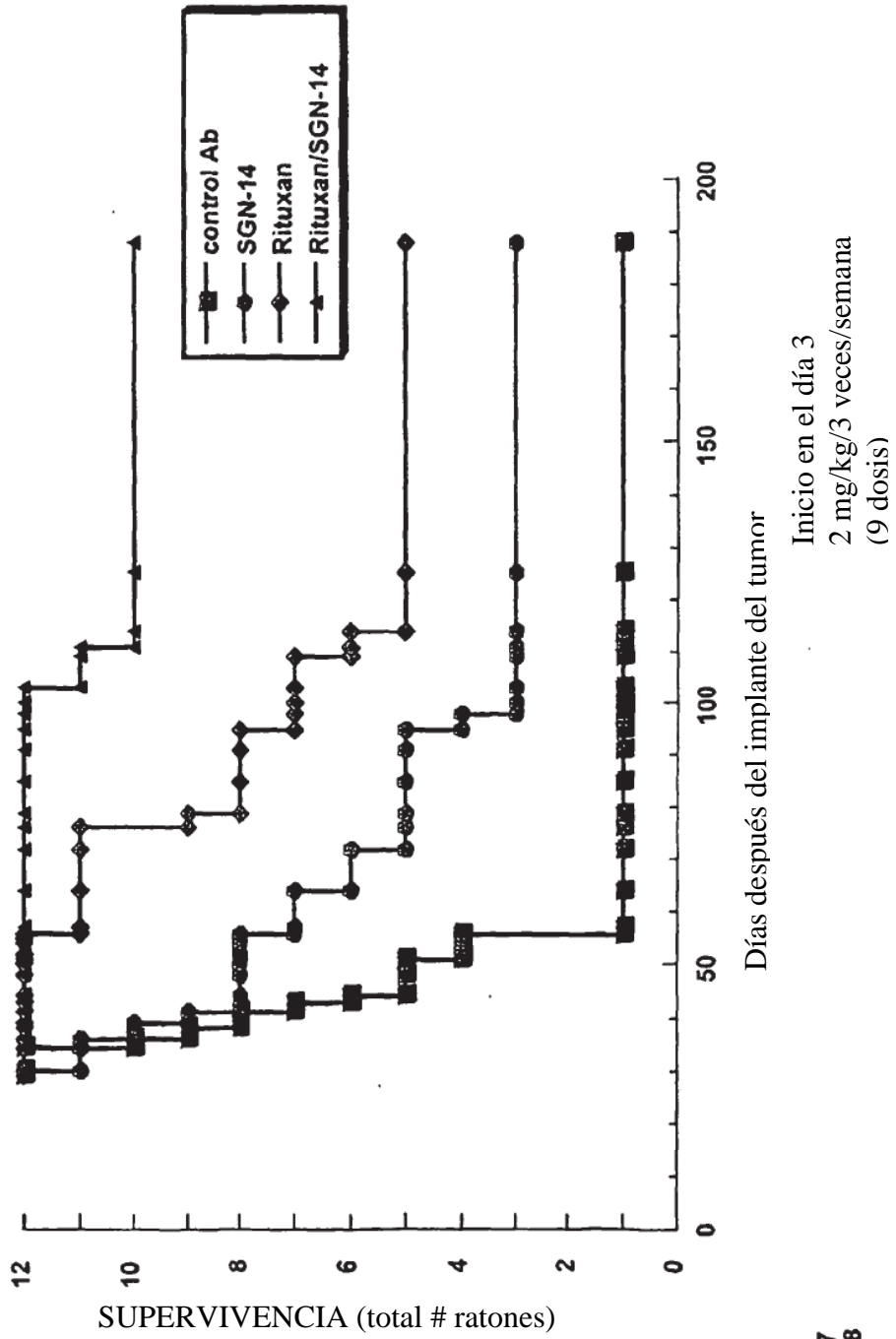


Fig. 4

99-527
000128

Actividad antitumoral de un anticuerpo anti-CD40 murino (SGN-14) y un anticuerpo anti-CD20 (marca RITUXAN®) sobre el Linfoma de Ramos resistente a la marca RITUXAN® trasplantado en ratones SCID

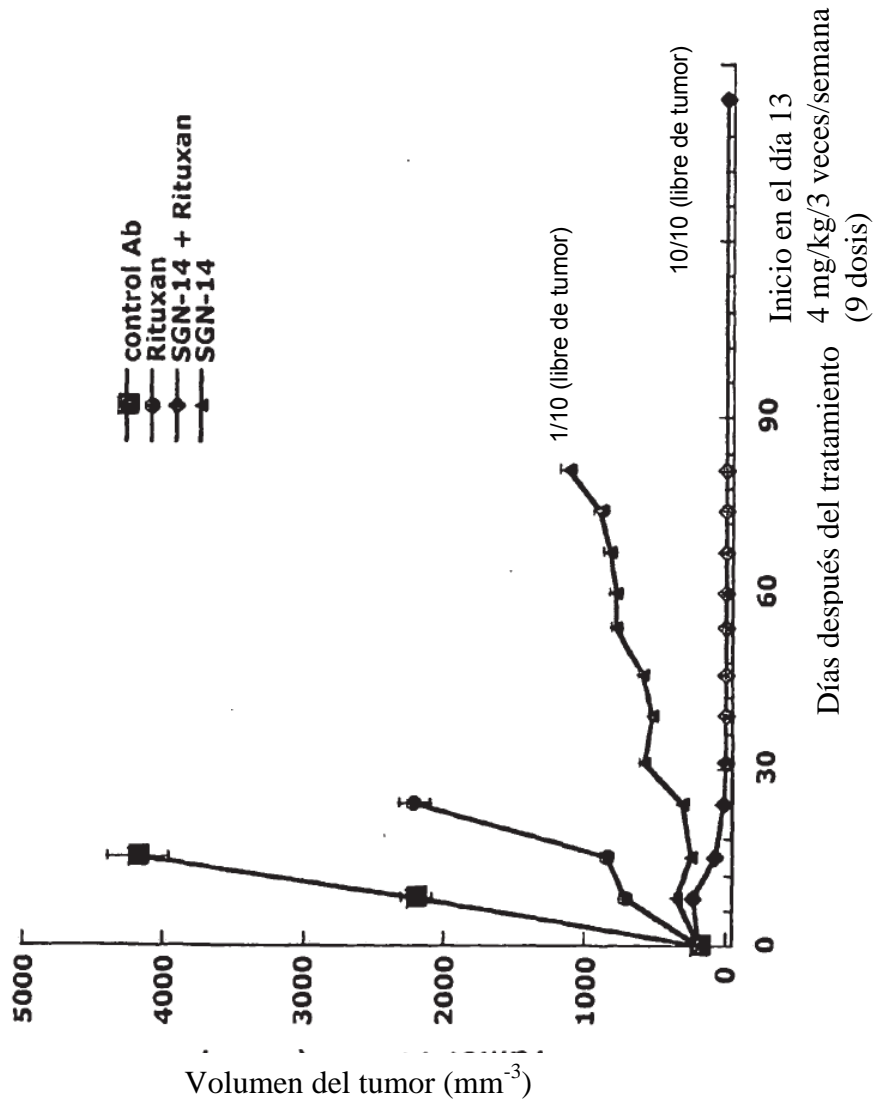


Fig.5