



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 892**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04810517 .5**

96 Fecha de presentación : **04.11.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1684869**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.08.2006**

54 Título: **Procedimientos de terapia para cánceres relacionados con células B.**

30 Prioridad: **04.11.2003 US 517337 P**  
**26.11.2003 US 525579 P**  
**27.04.2004 US 565710 P**  
**28.09.2004 US 613885 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.11.2011**

73 Titular/es: **Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc.**  
**4560 Horton Street**  
**Emeryville, California 94608-2916, US**  
**XOMA TECHNOLOGY Ltd.**

72 Inventor/es: **Long, Li;**  
**Luqman, Mohammad;**  
**Yabannavar, Asha y**  
**Zaror, Isabel**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 367 892 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**

Procedimientos de terapia para cánceres relacionados con células B

**Campo de la invención**

5 La presente invención versa acerca de procedimientos de terapia de combinación de anticuerpos para cánceres relacionados con células B, particularmente cánceres que comprenden células neoplásicas que expresan los antígenos de la superficie celular CD40 y CD20.

**Antecedentes de la invención**

10 La leucemia, el linfoma y el mieloma afectan a más de 100.000 individuos todos los años tan solo en EE. UU. Un gran porcentaje de estos casos se caracteriza por una hipertrofia de células B neoplásicas que expresan los antígenos CD40 y CD20. El CD40 es un antígeno de 55 kDa de la superficie celular presente en la superficie de las células B humanas, tanto normales como neoplásicas, de las células dendríticas, de otras células que presentan antígenos (APC), células endoteliales, células monocíticas y células epiteliales. La unión del ligando CD40 con el CD40 en la membrana de la célula B proporciona una señal coestimuladora positiva que estimula la activación y la proliferación de las células B, que dan como resultado la maduración de la célula B en una célula plasmática que segrega niveles elevados de inmunoglobulina soluble. Las células transformadas de pacientes con linfomas de células B de grado bajo y de grado alto, leucemia linfoblástica aguda de células B, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica y enfermedad de Hodgkin expresan el CD40. La expresión del CD40 se detecta también en dos de cada tres casos de leucemia mieloblástica aguda y en el 50 % de los linfomas relacionados con el sida. Las células B malignas de varios tumores con linaje de células B expresan un nivel elevado de CD40 y parecen depender de la señalización de CD40 para su supervivencia y proliferación. Esto hace del antígeno CD40 una diana potencial para una terapia anticancerosa.

25 El CD20 es expresado pronto en la diferenciación de las células B y permanece en la superficie celular a lo largo del desarrollo de la célula B. El CD20 está implicado en la activación de las células B, se expresa con niveles muy elevados en las células B neoplásicas y es una diana terapéutica clínicamente reconocida (véase, por ejemplo Hooijberg et al. (1995) Cancer Research 55:2627). La U.S. Food and Drug Administration ha autorizado el uso de anticuerpos, como el Rituxan®, que tienen como diana el CD20 para el tratamiento del linfoma no hodgkiniano (véase, por ejemplo, Boye et al. (2003) Ann. Oncol. 14:520). Se ha demostrado que el Rituxan® es un tratamiento efectivo para el linfoma no hodgkiniano (NHL) de grado bajo, intermedio y alto (véanse, por ejemplo, Maloney et al. (1994) Blood 84:2457-2466; McLaughlin et al. (1998) J. Clin. Oncol. 16:2825-2833; Maloney et al. (1997) Blood 90: 2188-2195; Hainsworth et. al. (2000) Blood 95:3052-3056; Colombat et al. (2001) Blood 97:101-106; Coiffier et al. (1998) Blood 92:1927-1932; Foran et al. (2000) J. Clin. Oncol. 18:317-324; Anderson et al. (1997) Biochem. Soc. Trans. 25: 705-708; Vose et al. (1999) Ann. Oncol. 10:58a).

35 Aunque no se conoce el mecanismo exacto de actuación, la evidencia indica que los efectos antilinfoma del Rituxan® son debidos en parte a la citotoxicidad mediada por complemento (CMC), la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), la inhibición de la proliferación celular y, por último, dirigen la inducción de la apoptosis. Sin embargo, algunos pacientes se vuelven resistentes al tratamiento con Rituxan® (Witzig et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20:3262; Grillo-López et al. (1998) J. Clin. Oncol. 16: 2825; Jazirehi et al. (2003) Mol. Cancer Ther. 2:1183-1193). Por ejemplo, algunos pacientes pierden la expresión de CD20 en células B malignas después de la terapia con anticuerpos anti CD20 (Davis et al. (1999) Clin. Cancer Res. 5:611). Además, del 30 % al 50 % de los paciente con NHL de grado bajo no muestran respuesta clínica alguna a este anticuerpo monoclonal (Hainsworth et. al. (2000) Blood 95:3052-3056; Colombat et al. (2001) Blood 97:101-106). Se precisan formas alternativas de intervención terapéutica para pacientes que desarrollan resistencia a este anticuerpo monoclonal o que tienen un linfoma de células B que es resistente a la terapia inicial con este anticuerpo.

45 Así, existe la necesidad de regímenes de tratamiento para cánceres relacionados con células B que no creen resistencia a los anticuerpos y que puedan proporcionar una terapia efectiva en caso de que ocurra una resistencia a los anticuerpos. En consecuencia, el descubrimiento de una terapia de combinación de anticuerpos con una actividad antitumoral superior a la del agente único Rituxan® podría mejorar drásticamente los procedimientos de terapia para el cáncer en individuos con mielomas, leucemias y linfomas, particularmente linfomas de células B.

50 Los documentos WO 01/83755 y WO 02/88186 describen anticuerpos capaces de unirse con el CD40, procedimientos para producir estos anticuerpos y procedimientos para su uso.

El documento WO 02/28480 describe el uso de anticuerpos anti CD40 en combinación con anticuerpos anti CD20 para el tratamiento cáncer en el que están implicadas células B malignas.

Ellmark et al. (Immunology 2002 106, 456-463) documentan la modulación de la interacción de CD40-ligando CD40 usando fragmentos monocatenarios de anticuerpos anti CD40 humanos.

55

**Breve resumen de la invención**

La invención proporciona un anticuerpo antagonista anti CD40 o un fragmento del mismo de unión al antígeno para su uso en un procedimiento para tratar a un sujeto humano de un cáncer caracterizado por un crecimiento neoplásico de células B mediante terapia de combinación de anticuerpos con un anticuerpo anti CD20 o un fragmento del mismo de unión al antígeno en el que dicho anticuerpo antagonista anti CD40 o dicho fragmento del mismo de unión al antígeno están seleccionados del grupo constituido por:

- a) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo capaz de unirse con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5542, o con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5543;
- b) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID nº 10 o en la SEC ID nº 12;
- c) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID nº 10 o en la SEC ID nº 12; y
- d) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5542 o el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5543 en un ensayo de unión competitiva.

La invención también proporciona el uso de una cantidad efectiva de un anticuerpo antagonista anti CD40 o un fragmento del mismo de unión al antígeno en la fabricación de un medicamento para ser usado para tratar a un sujeto humano de un cáncer caracterizado por un crecimiento neoplásico de células B mediante terapia de combinación de anticuerpos con un anticuerpo anti CD20 o un fragmento del mismo de unión al antígeno en el que dicho anticuerpo antagonista anti CD40 o dicho fragmento del mismo de unión al antígeno están seleccionados del grupo constituido por:

- a) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo capaz de unirse con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5542, o con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5543;
- b) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID nº 10 o en la SEC ID nº 12;
- c) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID nº 10 o en la SEC ID nº 12; y
- d) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5542 o el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5543 en un ensayo de unión competitiva.

La invención también proporciona un anticuerpo antagonista anti CD40 o un fragmento del mismo de unión al antígeno para su uso en un procedimiento para inhibir el crecimiento de un tumor que comprende células B neoplásicas mediante terapia de combinación de anticuerpos con un anticuerpo anti CD20 o un fragmento del mismo de unión al antígeno en el que dicho anticuerpo antagonista anti CD40 o dicho fragmento del mismo de unión al antígeno están seleccionados del grupo constituido por:

- a) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo capaz de unirse con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5542, o con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5543;
- b) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID nº 10 o en la SEC ID nº 12;
- c) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID nº 10 o en la SEC ID nº 12; y

- d) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5542 o el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5543 en un ensayo de unión competitiva.

La invención también proporciona el uso de una cantidad efectiva de un anticuerpo antagonista anti CD40 o un fragmento del mismo de unión al antígeno en la fabricación de un medicamento para ser usado para inhibir el crecimiento de un tumor que comprende células B neoplásicas mediante terapia de combinación de anticuerpos con un anticuerpo anti CD20 o un fragmento del mismo de unión al antígeno en el que dicho anticuerpo antagonista anti CD40 o dicho fragmento del mismo de unión al antígeno están seleccionados del grupo constituido por:

- a) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo capaz de unirse con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5542, o con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5543;
- b) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID nº 10 o en la SEC ID nº 12;
- c) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID nº 10 o en la SEC ID nº 12; y
- d) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5542 o el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5543 en un ensayo de unión competitiva.

La invención también proporciona un procedimiento *in vitro* para inhibir el crecimiento de un tumor que comprende células B neoplásicas que comprende poner en contacto dichas células con una cantidad efectiva de un anticuerpo antagonista anti CD40 o un fragmento del mismo de unión al antígeno en combinación con un anticuerpo anti CD20 o un fragmento del mismo de unión al antígeno, en el que dicho anticuerpo o dicho fragmento del mismo de unión al antígeno están seleccionados del grupo constituido por:

- a) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo capaz de unirse con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5542, o con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5543;
- b) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID nº 10 o en la SEC ID nº 12;
- c) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID nº 10 o en la SEC ID nº 12; y
- d) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5542 o el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5543 en un ensayo de unión competitiva.

Otros aspectos de la invención se presentan en las reivindicaciones adjuntas.

#### **Breve resumen de la revelación**

Se proporcionan procedimientos para tratar a un sujeto de cáncer caracterizado por un crecimiento neoplásico de células B. Los procedimientos comprenden la administración de una combinación de anticuerpos que tienen un efecto terapéutico contra células B neoplásicas que expresan los antígenos CD40 y CD20 de la superficie celular. En algunas realizaciones, ocurre un efecto terapéutico sinérgico, lo que hace que la revelación sea especialmente útil en el tratamiento de cánceres que son refractarios a la terapia con anticuerpos que tiene como diana un único antígeno de la superficie de la célula B.

Según los procedimientos dados a conocer en el presente documento, se administra, a un individuo que la necesite, una combinación de un anticuerpo antagonista anti CD40 (o un fragmento del mismo de unión al antígeno) y un anticuerpo anti CD20 (o un fragmento del mismo de unión al antígeno). Anticuerpos antagonistas anti CD40

5 adecuados para su uso en los procedimientos dados a conocer en el presente documento incluyen anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos de unión al antígeno que sean capaces de unirse específicamente con el antígeno CD40 humano expresado en la superficie de una célula humana. Están libres de una actividad agonista significativa, pero presentan actividad antagonista cuando se unen con el antígeno CD40 sobre células humanas, particularmente cuando se unen con el antígeno CD40 en células B neoplásicas humanas. Los anticuerpos monoclonales anti CD40 adecuados tienen regiones humanas constantes; preferentemente, también tienen regiones de entramado parcialmente humanizadas; y lo más preferente es que sean anticuerpos plenamente humanos o fragmentos de los mismos de unión al antígeno). Ejemplos de tales anticuerpos monoclonales anti CD40 son los anticuerpos designados en el presente documento como CHIR-5.9 y CHIR-12.12, que pueden ser producidos de forma recombinante; los anticuerpos monoclonales producidos por las líneas celulares de hibridoma designadas 131.2F8.5.9 (a la que se hace referencia en el presente documento como línea celular 5.9) y 153.8E2.D10.D6.12.12 (a la que se hace referencia en el presente documento como línea celular 12.12); un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia mostrada en la SEC ID nº 6, la secuencia mostrada en la SEC ID nº 7, la secuencia mostrada en la SEC ID nº 8, la secuencia mostrada tanto en la SEC ID nº 6 como en la SEC ID nº 7, y la secuencia mostrada tanto en la SEC ID nº 6 como en la SEC ID nº 8; un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia mostrada en la SEC ID nº 2, la secuencia mostrada en la SEC ID nº 4, la secuencia mostrada en la SEC ID nº 5, la secuencia mostrada tanto en la SEC ID nº 2 como en la SEC ID nº 4, y la secuencia mostrada tanto en la SEC ID nº 2 como en la SEC ID nº 5; un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia mostrada en la SEC ID nº 1, la secuencia mostrada en la SEC ID nº 3, y la secuencia mostrada tanto en la SEC ID nº 1 como en la SEC ID nº 3; y fragmentos de estos anticuerpos monoclonales de unión al antígeno que retienen la capacidad de unirse específicamente con el CD40 humano y que están libres de una actividad agonista significativa, pero presentan actividad antagonista cuando se unen con el antígeno CD40 sobre células humanas. Ejemplos de tales anticuerpos monoclonales anti CD40 incluyen también un anticuerpo monoclonal que se une con un epítipo capaz de unirse con el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular 12.12 de hibridoma o el producido por la línea celular 5.9 de hibridoma; un anticuerpo monoclonal que se une con un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID nº 10 o en la SEC ID nº 12; un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 en un ensayo de unión competitiva; y un anticuerpo monoclonal que es un fragmento del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 de unión al antígeno o cualquiera de los anticuerpos monoclonales precedentes en los que el fragmento retiene la capacidad de unirse específicamente con el antígeno CD40 humano.

Anticuerpos anti CD20 adecuados para poner en práctica la revelación incluyen, sin limitación, el anticuerpo monoclonal quimérico IDEC-C2B8 (Rituxan® o rituximab); anticuerpos anti CD20 que tengan las características de unión del IDEC-C2B8, en los que los anticuerpos anti CD20 compiten con el anticuerpo IDEC-C2B8 en un ensayo de unión competitiva o se unen con un epítipo capaz de unirse con el anticuerpo IDEC-C2B8. Los procedimientos dados a conocer en el presente documento son particularmente efectivos cuando se administran anticuerpos antagonistas anti CD40 producidos por un hibridoma como 5.9 o 12.12 en combinación con un anticuerpo anti CD20 como IDEC-C2B8. La revelación incluye, además, composiciones farmacéuticas que comprenden tales combinaciones de anticuerpos en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los procedimientos dados a conocer en el presente documento son útiles para tratar individuos con linfomas de células B tales como linfomas no hodgkinianos (linfomas de grado elevado, linfomas de grado intermedio y linfomas de grado bajo), la enfermedad de Hodgkin, leucemias linfoblásticas agudas, mielomas, leucemias linfocíticas crónicas y leucemias mieloblásticas, y son particularmente útiles para el tratamiento de cánceres relacionados con células B que son refractarios al tratamiento con una terapia de un único anticuerpo que tiene como diana el antígeno CD20 de la superficie celular.

### **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra el efecto, con el paso del tiempo, de la administración combinada del mAb CHIR-12.12 y el mAb IDEC-C2B8 en el volumen del tumor en un modelo murino de tumor resistente al Rituxan®.

La Figura 2 expone las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada del mAb CHIR-12.12. En la Figura 2A se muestran las regiones delantera (residuos 1-20 de la SEC ID nº 2), variable (residuos 21-132 de la SEC ID nº 2) y constante (residuos 133-239 de la SEC ID nº 2) de la cadena ligera. En la Figura 2B se muestran las regiones delantera (residuos 1-19 de la SEC ID nº 4), variable (residuos 20-139 de la SEC ID nº 4) y constante (residuos 140-469 de la SEC ID nº 4) de la cadena pesada. La región constante alternativa de la cadena pesada del mAb CHIR-12.12 mostrada en la Figura 2B refleja una sustitución de un residuo de alanina por el residuo de serina en la posición 153 de la SEC ID nº 4. La secuencia completa de esta variante de la cadena pesada del mAb CHIR-12.12 se presenta en la SEC ID nº 5.

La Figura 3 muestra la secuencia de codificación de la cadena ligera (Figura 3A; SEC ID nº 1) y de la cadena pesada (Figura 3B; SEC ID nº 3) para el mAb CHIR-12.12.

- 5 La Figura 4 presenta las secuencias de aminoácidos para las cadenas ligera y pesada del mAb CHIR-5.9. En la Figura 4A se muestran las regiones delantera (residuos 1-20 de la SEC ID nº 6), variable (residuos 21-132 de la SEC ID nº 6) y constante (residuos 133-239 de la SEC ID nº 6) de la cadena ligera. En la Figura 4B se muestran las regiones delantera (residuos 1-19 de la SEC ID nº 7), variable (residuos 20-144 de la SEC ID nº 7) y constante (residuos 145-474 de la SEC ID nº 7) de la cadena pesada. La región constante alternativa de la cadena pesada del mAb CHIR-5.9 mostrada en la Figura 4B refleja una sustitución de un residuo de alanina por el residuo de serina en la posición 158 de la SEC ID nº 7. La secuencia completa de esta variante de la cadena pesada del mAb CHIR-5.9 se presenta en la SEC ID nº 8.
- 10 La Figura 5 muestra la secuencia de codificación (Figura 5A; SEC ID nº 9) de la isoforma corta del CD40 humano (secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 5B; SEC ID nº 10) y la secuencia de codificación (Figura 5C; SEC ID nº 11) de la isoforma larga del CD40 humano (secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 5D; SEC ID nº 12).
- 15 La Figura 6 muestra la temperatura de fusión térmica del CHIR-12.12 en formulaciones de pH diferente medida por calorimetría diferencial de barrido (DSC).

### **Descripción detallada**

“Tumor”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sea maligno o benigno, y a todas las células y todos los tejidos precancerosos y cancerosos. “Neoplásico”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier forma de crecimiento celular desregulado o no regulado, ya sea maligno o benigno, que resulte en un crecimiento anormal de tejido.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen la condición fisiológica en los mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, sin limitación, el linfoma y la leucemia. Por “cáncer relacionado con células B” se quiere significar cualquier tipo de cáncer en el que el crecimiento celular desregulado o no regulado está asociado con células B.

25 Por “refractario”, en el contexto de un cáncer, se quiere significar que el cáncer particular es resistente a la terapia con un agente terapéutico particular, o que no responde a la misma. Un cáncer puede ser refractario a una terapia con un agente terapéutico particular bien desde el inicio del tratamiento con el agente terapéutico particular (es decir, no responde a la exposición inicial al agente terapéutico), o bien como consecuencia del desarrollo de resistencia al agente terapéutico, ya sea durante el curso de un primer periodo de tratamiento con el agente terapéutico o durante un periodo de tratamiento subsiguiente con el agente terapéutico.

“Anticuerpos” e “inmunoglobulinas” (Ig) son glucoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Los términos se usan de forma sinónima. En algunos casos, la especificidad del antígeno de la inmunoglobulina puede ser conocida.

35 Se usa el término “anticuerpo” en el sentido más amplio y abarca anticuerpos completamente ensamblados, fragmentos de anticuerpos que pueden unirse con un antígeno (por ejemplo, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, anticuerpos monocatenarios, diacuerpos, quimeras de anticuerpo, anticuerpos híbridos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos humanizados y similares) y péptidos recombinantes que comprenden los anteriores.

40 Los términos “anticuerpo monoclonal” y “mAb”, tal como se usan en el presente documento, se refieren a un anticuerpo obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, salvo en posibles mutaciones que se den de forma natural que puedan estar presentes en cantidades de menor importancia. Tal como se usa en el presente documento, “anticuerpo anti CD40” abarca cualquier anticuerpo que reconozca específicamente el antígeno CD40 de la superficie celular, incluyendo anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos monocatenarios y fragmentos de los mismos, como Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, y otros fragmentos que retienen la función de unión al antígeno del anticuerpo padre anti CD40. De particular interés para poner en práctica los procedimientos dados a conocer en el presente documento son los anticuerpos anti CD40 o los fragmentos de los mismos de unión al antígeno que tienen las propiedades de unión que presentan los anticuerpos monoclonales anti CD40 humanos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos más abajo en el presente documento.

50 Tal como se usa en el presente documento, “anticuerpo anti CD20” abarca cualquier anticuerpo que reconozca específicamente el antígeno CD20 de la superficie celular, incluyendo anticuerpos policlonales anticuerpos monoclonales, anticuerpos monocatenarios y fragmentos de los mismos, como Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, y otros fragmentos que retienen la función de unión al antígeno del anticuerpo padre anti CD20. De particular interés para poner en práctica los procedimientos dados a conocer en el presente documento son los anticuerpos anti CD20 o los fragmentos de los mismos de unión al antígeno que tienen las propiedades de unión que presenta el anticuerpo monoclonal IDEC-C2B8 descrito más abajo en el presente documento.

“Anticuerpos nativos” e “inmunoglobulinas nativas” son normalmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltones, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está ligada a una cadena pesada por medio de un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera tiene también puentes intracatenarios de disulfuro regularmente separados. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable ( $V_H$ ) seguido por varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable ( $V_L$ ) en un extremo y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de las cadenas ligera y pesada.

El término “variable” se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en secuencia entre los anticuerpos. Las regiones variables confieren especificidad en la unión con los antígenos. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida de manera uniforme a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos llamados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables están encasillados en las regiones de entramado (FR). Los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de hoja plegada  $\beta$ , conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan la estructura de la hoja plegada  $\beta$ , y en algunos casos forman parte de la misma. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por medio de las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión del antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al. (1991) NIH Publ. N° 91-3242, Vol. I, páginas 647-669).

Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo con un antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras, tales como la unión del receptor de Fc, la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos, la iniciación de la citotoxicidad dependiente del complemento y la desgranulación de los mastocitos.

La expresión “región hipervariable”, cuando se usa en el presente documento, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a los antígenos. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una “región determinante de la complementariedad” o “CDR” (es decir, los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (5ª ed., Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, Maryland) y/o los residuos de un “bucle hipervariable” (es decir, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Clothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917). Los residuos del “entramado” o “FR” son los residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable, según se estima en el presente documento.

Los “fragmentos de anticuerpos” comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión al antígeno o la región variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab',  $F(ab')_2$  y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (Zapata et al. (1995) Protein Eng. 10:1057-1062); moléculas de anticuerpos monocatenarios; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, denominados fragmentos “Fab”, cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento residual “Fc”, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento  $F(ab')_2$  que tiene dos sitios de combinación con antígenos y sigue siendo susceptible de entrecruzamiento con antígenos.

“Fv” es el fragmento mínimo del anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión al antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y un dominio de cadena ligera en estrecha asociación, no covalente. Precisamente en esta configuración las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero  $V_H-V_L$ . Colectivamente, las seis CDR confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una menor afinidad que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante ( $C_{H1}$ ) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' por la adición de algunos residuos en el extremo terminal carboxi del dominio  $C_{H1}$  de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región de bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para el Fab' en el que el o los residuos cisteína de los dominios constantes tienen un grupo tiol libre. Los fragmentos Fab' se producen reduciendo el puente disulfuro de la cadena pesada del fragmento  $F(ab')_2$ . También se conocen otros emparejamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las “cadenas ligeras” de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden ser asignadas a uno de dos tipos claramente diferentes, denominados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

5 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden ser asignadas a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas humanas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de estas pueden dividirse además en subclases (isotipos); por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de las cadenas pesadas que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Los diferentes isotipos tienen funciones efectoras diferentes. Por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG3 tienen actividad de ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos).

10 La palabra “marcador”, cuando se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o a una composición detectables que se conjugan directamente o indirectamente con el anticuerpo para generar un anticuerpo “marcado”. El marcador puede ser detectable por sí solo (por ejemplo, marcadores radioisotópicos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o una composición de sustrato que es detectable. Los radionúclidos que pueden servir como marcadores detectables incluyen, por ejemplo, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212 y Pd-109. El marcador puede también ser una entidad no detectable, tal como una toxina.

15 El término “antagonista” se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que bloquee parcial o totalmente, inhiba o neutralice una actividad biológica de una diana nativa dada a conocer en el presente documento o su transcripción o traducción.

20 “Vehículos”, tal como se usa en el presente documento, incluye los vehículos, los excipientes o los estabilizadores farmacéuticamente aceptables que son no tóxicos para la célula o el mamífero que se exponen a los mismos en las dosis y concentraciones usadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una disolución acuosa de pH tamponado. Ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluido el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (con menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluidos glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como el sodio; y/o tensoactivos no iónicos tales como TWEEN, polietilenglicol (PEG) y poloxámeros (Pluronic). La administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y la administración consecutiva (es decir, secuencial) en cualquier orden.

25 Una “célula anfitriona”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un microorganismo o a una célula o línea celular de eucariota cultivados como una entidad unicelular que pueden usarse, o se han usado, como receptor de un vector recombinante u otros polinucleótidos de transferencia, e incluyen a la progenie de la célula original que se ha transfectado. Se entiende que la progenie de una célula única puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en complemento de ADN genómico o total a la original, por las mutaciones naturales, accidentales o deliberadas.

30 “Células efectoras humanas” son leucocitos que expresan uno o más FcR y que realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos Fc $\gamma$ RIII y llevan a cabo la función efectora de citotoxicidad mediada por células dependientes de antígenos (ADCC). Ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, macrófagos, eosinófilos y neutrófilos, siendo las de preferencia las PBMC y las células NK. Los anticuerpos que tienen actividad ADCC son normalmente del isotipo IgG1 o del IgG3. Obsérvese que además de aislar anticuerpos IgG1 e IgG3, tales anticuerpos que median la ADCC pueden generarse diseñando una región variable a partir de un anticuerpo que no medie la ADCC o de un fragmento de región variable sobre una región constante del isotipo IgG1 o IgG3.

35 Los términos “receptor de Fc” o “FcR” se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR de preferencia es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR de preferencia es aquel que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye a los receptores de las subclases Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII, incluidas las variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativas de estos receptores. Los receptores Fc $\gamma$ RII incluyen Fc $\gamma$ RIIA (un “receptor activador”) y Fc $\gamma$ R IIB (un “receptor inhibidor”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplasmáticos. El receptor activador Fc $\gamma$ RIIA contiene un motivo de activación de inmunorreceptores basados en tirosina (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor Fc $\gamma$ R IIB contiene un motivo de inhibición de inmunorreceptores basados en tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático (véase Daeron (1997) Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234). Los FcR son objeto de reseña en Ravetch y Kinet (1991) Annu. Rev. Immunol. 9: 457-492 (1991); Capel et al. (1994) Immunomethods 4: 25-34; y de Haas et al. (1995) J. Lab. Clin. Med. 126: 330-341. Otros FcR, incluidos los que se identificarán en el futuro, están abarcados por el término “FcR” en el presente documento. El término incluye también el receptor neonatal, FcRn, que es



responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer et al. (1976) J. Immunol. 117:587 y Kim et al. (1994) J. Immunol. 24:249).

El término "sinergia" se usa para describir un efecto combinado de dos o más agentes activos que es mayor que la suma de los efectos individuales de cada agente activo respectivo. Así, cuando el efecto combinado de dos o más agentes da como resultado una "inhibición sinérgica" de un actividad o un proceso, por ejemplo el crecimiento tumoral, se pretende que la inhibición de la actividad o el proceso es mayor que la suma de los efectos inhibitorios de cada agente activo respectivo. La expresión "efecto terapéutico sinérgico" se refiere a un efecto terapéutico observado con una combinación de dos o más terapias en las que el efecto terapéutico (según es medido por cualquiera de varios parámetros) es mayor que la suma de los efectos terapéuticos individuales observados con las respectivas terapias individuales.

Se pretende que las expresiones "dosis terapéuticamente efectiva", "cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad efectiva" signifiquen una cantidad del anticuerpo antagonista anti CD40 (o del fragmento del mismo de unión al antígeno) que, cuando se administra en combinación con una cantidad del anticuerpo anti CD20 (o del fragmento del mismo de unión al antígeno), produce una respuesta terapéutica positiva en un sujeto que padece cáncer que comprende células B neoplásicas.

### **Terapia de combinación con anticuerpos anti CD40 y anti CD20**

La presente revelación versa acerca de procedimientos de tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer caracterizado por un crecimiento de células B neoplásicas. Tales células B neoplásicas incluyen, sin limitación, células B neoplásicas derivadas de linfomas que incluyen linfomas de células B grados bajo, intermedio y alto, linfomas inmunoblásticos, linfomas no hodgkinianos, la enfermedad de Hodgkin, linfomas inducidos por el virus de Epstein-Barr (VEB), linfomas relacionados con el sida, así como leucemias linfoblásticas agudas, mielomas, leucemias linfocíticas crónicas, leucemias mieloblásticas agudas y similares.

Los procedimientos dados a conocer en el presente documento abarcan una terapia de combinación de anticuerpos con un anticuerpo antagonista anti CD40, o un fragmento del mismo de unión al antígeno, y un anticuerpo anti CD20, o un fragmento del mismo de unión al antígeno. Los procedimientos dados a conocer en el presente documento son especialmente útiles para el tratamiento de cánceres que comprenden células B neoplásicas que expresan a la vez los antígenos de la superficie celular CD40 y CD20, como los linfomas de células B. Ejemplos de linfomas que pueden expresar los antígenos CD40 y CD20 incluyen, sin limitación, leucemia linfoblástica aguda de células B, enfermedad de Hodgkin, linfoma linfocítico difuso de células pequeñas, leucemia prolinfocítica, linfoma del tejido linfoide asociado con mucosas, linfoma monocitoide de células B, linfoma esplénico, granulomatosis linfomatoide, linfomatosis intravascular, linfoma inmunoblástico, linfoma relacionado con el sida y similares.

Así, los procedimientos dados a conocer en el presente documento hallan uso en el tratamiento de linfomas no hodgkinianos relacionados con la proliferación o la acumulación anormal e incontrolable de células B. Para los fines de la revelación, se hará referencia a tales linfomas según el modelo de clasificación de formulación de trabajo, es decir, a aquellos linfomas de células B catalogados como de grado bajo, grado intermedio y grado alto (véase "The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project", Cancer 49 (1982):2112-2135). Así, los linfomas de células B de grado bajo incluyen los linfomas linfocíticos de células pequeñas, los foliculares de células pequeñas hendidas, y los foliculares mixtos de células pequeñas hendidas y células grandes; los linfomas de células B de grado intermedio incluyen los linfomas foliculares de células grandes, los difusos de células pequeñas hendidas, los difusos mixtos de células pequeñas y grandes y los difusos de células grandes; y los linfomas de células B de grado alto incluyen los linfomas inmunoblásticos de células grandes, los linfoblásticos y los de células pequeñas no hendidas del tipo Burkitt y del que no lo es.

Se admite que los procedimientos dados a conocer en el presente documento son útiles en el tratamiento terapéutico de linfomas de células B que se clasifican según el sistema de clasificación europea revisada y norteamericana de linfomas (REAL). Tales linfomas de células B incluyen, sin limitación, linfomas clasificados como neoplasmas precursores de células B, como la leucemia o el linfoma linfoblásticos B; neoplasmas periféricos de células B, incluyendo la leucemia crónica de células B/el linfoma linfocítico de células pequeñas, el linfoma/inmunocitoma linfoplasmacitoide, el linfoma de células del manto (MCL), el linfoma folicular central (folicular) (incluyendo los linfomas difuso de células pequeñas, difuso mixto de células pequeñas y grandes y difuso de células grandes), el linfoma de células B de la zona marginal (incluyendo los tipos extranodal, nodal y esplénico), la leucemia de células peludas, plasmacitoma/mieloma, linfoma difuso de células B de células grandes del subtipo mediastínico primario (tímico), linfoma de Burkitt y linfoma de células B de alto grado semejante al de Burkitt; leucemias agudas; leucemias linfocíticas agudas; leucemias mieloblásticas; leucemias mielocíticas agudas; leucemia promielocítica; leucemia mielomonocítica; leucemia monocítica; eritroleucemia; leucemia granulocítica (leucemia mielocítica crónica); leucemia linfocítica crónica; policitemia vera; mieloma múltiple; macroglobulinemia de Waldenstrom; enfermedad de las cadenas pesadas y linfomas inclasificables de células B de grado bajo o de grado alto.

En particular, los procedimientos dados a conocer en el presente documento son útiles para el tratamiento de linfomas de células B, incluyendo los enumerados más arriba, que son refractarios (es decir, resistentes o que se

han vuelto resistentes) a los tratamientos oncoterapéuticos de primera línea. Se pretende que el término “oncoterapéutico” signifique un tratamiento para el cáncer como la quimioterapia, la cirugía, la terapia por radiación, la terapia simple de anticuerpos anticancerosos y combinaciones de las mismas.

5 “Tratamiento” se define en el presente documento como la aplicación o la administración de un anticuerpo antagonista anti CD40 o un fragmento del mismo de unión al antígeno a un sujeto, o la aplicación o la administración de un anticuerpo antagonista anti CD40 o un fragmento del mismo a un tejido o una línea celular aislados procedentes de un sujeto, en combinación con la aplicación o la administración de un anticuerpo anti CD20 o un fragmento del mismo de unión al antígeno a un sujeto, o a un tejido o una línea celular aislados procedentes de un sujeto, en las que el sujeto tiene una enfermedad, un síntoma de una enfermedad o una predisposición a la enfermedad, en las que el propósito es curar, sanar, calmar, mitigar, alterar, remediar, aliviar, mejorar o afectar a la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición a la enfermedad. Con “tratamiento” también se quiere significar que la combinación de estos anticuerpos o de los fragmentos de los mismos de unión al antígeno puede ser aplicada o administrada al sujeto, o al tejido o la línea celular aislados procedentes del sujeto, como parte de una composición farmacéutica simple o, alternativamente, como parte de composiciones farmacéuticas individuales, cada una de las cuales comprende o bien el anticuerpo anti CD40 (o el fragmento del mismo de unión al antígeno) o bien el anticuerpo anti CD20 (o un fragmento del mismo de unión al antígeno), en la que el sujeto tiene una enfermedad, un síntoma de una enfermedad o una predisposición a una enfermedad, en la que el propósito es curar, sanar, calmar, mitigar, alterar, remediar, aliviar, mejorar o afectar a la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición a la enfermedad.

20 Los anticuerpos anti CD40 adecuados para su uso en los procedimientos dados a conocer en el presente documento se unen específicamente con un antígeno CD40 humano expresado en la superficie de una célula humana y están libres de una actividad agonista significativa cuando están unidos al antígeno CD40 en una célula humana que exprese el CD40, incluyendo las células B humanas normales y neoplásicas (ya sean malignas o benignas). En algunas realizaciones, su unión al CD40 mostrada en la superficie de células humanas resulta en la inhibición de la proliferación y la diferenciación de estas células humanas. Así, los anticuerpos antagonistas anti CD40 adecuados para su uso en los procedimientos dados a conocer en el presente documento incluyen aquellos anticuerpos monoclonales que pueden presentar actividad antagonista hacia células humanas normales y neoplásicas que expresan el antígeno CD40 en la superficie celular. En el presente documento se hace referencia a estos anticuerpos anti CD40 y los fragmentos de los mismos de unión al antígeno como “anticuerpos antagonistas anti CD40”. Tales anticuerpos incluyen, sin limitación, los anticuerpos monoclonales plenamente humanos CHIR-5.9 y CHIR-12.12, descritos más abajo, y los anticuerpos monoclonales que tienen las características de unión de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12. Estos anticuerpos monoclonales, que pueden ser producidos de forma recombinante, son descritos más abajo.

35 Además de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR.12.12, otros anticuerpos anti CD40 que serían útiles en la puesta en práctica de los procedimientos descritos en el presente documento incluyen, sin limitación: (1) los anticuerpos monoclonales producidos por las líneas celulares de hibridoma designadas 131.2F8.5.9 (a la que se hace referencia en el presente documento como línea celular 5.9) y 153.8E2.D10.D6.12.12 (a la que se hace referencia en el presente documento como línea celular 12.12), depositadas en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5542 y Depósito de Patente nº PTA-5543, respectivamente; (2) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia mostrada en la SEC ID nº 2, la secuencia mostrada en la SEC ID nº 4, la secuencia mostrada en la SEC ID nº 5, la secuencia mostrada tanto en la SEC ID nº 2 como en la SEC ID nº 4, y la secuencia mostrada tanto en la SEC ID nº 2 como en la SEC ID nº 5; (3) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia mostrada en la SEC ID nº 6, la secuencia mostrada en la SEC ID nº 7, la secuencia mostrada en la SEC ID nº 8, la secuencia mostrada tanto en la SEC ID nº 6 como en la SEC ID nº 7, y la secuencia mostrada tanto en la SEC ID nº 6 como en la SEC ID nº 8; (4) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia mostrada en la SEC ID nº 1, la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID nº 3, y la secuencia mostrada tanto en la SEC ID nº 1 como en la SEC ID nº 3; (5) un anticuerpo monoclonal que se une con un epítipo capaz de unirse con el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 5.9 o línea celular de hibridoma 12.12; (6) un anticuerpo monoclonal que se une con un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID nº 10 o en la SEC ID nº 12; (7) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitiva; y (8) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 de unión al antígeno o de los anticuerpos monoclonales anteriores en los elementos precedentes (1)-(7), en los que el fragmento retiene la capacidad de unirse específicamente con el CD40 humano. Los expertos en la técnica admiten que los anticuerpos y los fragmentos de estos anticuerpos de unión al antígeno, adecuados para su uso en los procedimientos dados a conocer en el presente documento, incluyen anticuerpos y fragmentos de los mismos de unión al antígeno que son producidos de forma recombinante usando procedimientos bien conocidos en la técnica y descritos más abajo en el presente documento e incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 que han sido producidos de forma recombinante.

Los anticuerpos anti CD20 adecuados para su uso en los procedimientos dados a conocer en el presente documento se unen específicamente al antígeno CD20 humano expresado en la superficie de una célula humana. Los anticuerpos anti CD20 útiles en la puesta en práctica de esta revelación pueden tener uno o muchos mecanismos de acción. Aunque los procedimientos dados a conocer en el presente documento no están limitados por ningún mecanismo de acción particular, se ha demostrado que los anticuerpos anti CD20 inducen, al menos, la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la regulación de la proliferación a la baja y la apoptosis en las células diana. Tales anticuerpos incluyen, sin limitación, el anticuerpo IDEC-C2B8 (Biogen Idec Pharmaceuticals Corp., Cambridge, Massachusetts; disponible comercialmente con el nombre comercial Rituxan®, al que también se hace referencia como rituximab) que es un anticuerpo monoclonal quimérico anti CD20 que contiene IgG1 humana y regiones constantes kappa con regiones variables murinas aisladas procedentes de un anticuerpo monoclonal murino anti CD20, IDEC-2B8 (Reff et al. (1994) Blood 83:435-445; véase también la patente estadounidense nº 5.736.137); el anticuerpo radiomarcado anti CD20 Zevalin® (Ibritumomab tiuxetan), fabricado por Biogen IDEC Pharmaceuticals Corp. (Cambridge, Massachusetts); Bexxar® (Tositumomab, que es la versión murina de rituximab, combinado con Tositumomab marcado con yodo (I-131), fabricado por Corixa Corp. (Seattle, Washington); el anticuerpo plenamente humano HuMax-CD20; R-1594; IMMU-106; TRU-015; AME-133; y anticuerpos monoclonales que tienen las características de unión del IDEC-C2B8, o sea, la especificidad de unión del IDEC-C2B8 y la capacidad de inducir una o más de las siguientes actividades cuando están unidos al antígeno CD20 o a células B que expresan CD20: (1) citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); (2) citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); (3) regulación a la baja de la proliferación de células B; y (4) apoptosis en las células diana. Los ensayos *in vitro* e *in vivo* para medir la capacidad de los anticuerpos anti CD20 para inducir estas actividades son bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, los ensayos dados a conocer en la patente estadounidense nº 5.736.137. Otros anticuerpos útiles para la puesta en práctica de los procedimientos dados a conocer en el presente documento son anticuerpos murinos y humanos anti CD20 conjugados con radiomarcas, como In-111 e Y-90, y otros agentes terapéuticos, como las toxinas.

Además de usar los anticuerpos antagonistas anti CD40 y los anticuerpos anti CD20 mencionados más arriba, y descritos más plenamente en el presente documento más abajo, los procedimientos dados a conocer en el presente documento pueden ser puestos en práctica usando anticuerpos que tengan las características de unión de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9, CHIR-12.12 o IDEC-C2B8 y que interfieran competitivamente con la unión de estos anticuerpos a sus respectivos antígenos o que se unan con los mismos epítopos. Un experto en la técnica podría determinar si un anticuerpo interfiere competitivamente con la unión de CHIR-5.9, CHIR-12.12 o IDEC-C2B8 usando procedimientos estándar.

La terapia de combinación con anticuerpos anti CD20 (o con fragmentos de los mismos de unión al antígeno) y anticuerpos antagonistas anti CD40 (o con fragmentos de los mismos de unión al antígeno) proporciona un beneficio terapéutico que es mayor que el proporcionado por el uso de cualquiera de estos agentes anticancerosos por sí solo. Además, estos dos tipos de anticuerpos pueden ser usados en combinación para tratar tumores que son refractarios al tratamiento con una terapia de anticuerpos simple, particularmente la terapia con anticuerpos anti CD20, ya sea como resultado de una resistencia inicial a la terapia de anticuerpos simple o como resultado de una resistencia que se desarrolla durante una o más sesiones de terapia con el anticuerpo único. En otras realizaciones adicionales, la terapia de combinación con estos dos anticuerpos tiene un efecto terapéutico sinérgico contra tumores que son refractarios o no refractarios (es decir, sensibles) a la terapia con el anticuerpo único. En algunas realizaciones, los procedimientos dados a conocer en el presente documento comprenden una terapia de combinación con el anticuerpo monoclonal anti CD20 IDEC-C2B8 y el anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR-12.12. En otras realizaciones, los procedimientos dados a conocer en el presente documento comprenden una terapia de combinación con el anticuerpo monoclonal anti CD20 IDEC-C2B8 y el anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR-5.9. En otras realizaciones adicionales, los procedimientos dados a conocer en el presente documento comprenden una terapia de combinación con un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal anti CD20 IDEC-C2B8 y un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR-12.12 o CHIR-5.9. En realizaciones alternativas, los procedimientos dados a conocer en el presente documento comprenden una terapia de combinación con el anticuerpo monoclonal anti CD20 IDEC-C2B8 y un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR-12.12 o CHIR-5.9. En otras realizaciones, los procedimientos dados a conocer en el presente documento comprenden una terapia de combinación con un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal anti CD20 IDEC-C2B8 y el anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR-12.12 o CHIR-5.9. La terapia de combinación descrita en el presente documento puede comprender otras variaciones, siempre que tanto el antígeno CD20 como el CD40 sean diana del procedimiento de tratamiento.

Múltiples parámetros pueden ser indicativos de la eficacia del tratamiento. Estos incluyen, sin limitación, una reducción en el tamaño de la masa tumoral; una reducción en la invasividad metastásica del tumor; una reducción en la tasa de crecimiento del tumor; una disminución en la gravedad o la incidencia de secuelas relacionadas con los tumores, como la caquexia y la producción de ascitis; una disminución y/o prevención de complicaciones relacionadas con los tumores, como las fracturas patológicas óseas, la anemia hemolítica autoinmune, la transformación prolinfocítica, el síndrome de Richter y similares; la sensibilización del tumor a la quimioterapia y otros tratamientos; un aumento del índice de supervivencia del paciente; un aumento en correlatos clínicos observados de pronóstico mejorado, como un aumento en los linfocitos que infiltran el tumor y una disminución de la

vascularización del tumor; y similares. Así, en algunas realizaciones, la administración de la combinación de estos dos tipos de anticuerpos dará como resultado una mejora de uno o más de estos parámetros en un paciente (es decir, un sujeto) que está sometido al tratamiento. En otras realizaciones, las mejoras en el paciente serán sinérgicas con respecto a algunos parámetros, pero aditivas en lo que respecta a otros.

5 Por “respuesta terapéutica positiva” con respecto al tratamiento del cáncer se quiere decir una mejora en el tratamiento en asociación con la actividad antitumoral de estos anticuerpos o de los fragmentos de los mismos, y/o una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad. Es decir, pueden observarse un efecto antiproliferativo, la prevención de más hipertrofias tumorales, una reducción en el tamaño del tumor, una reducción en el número de células cancerosas y/o una disminución en uno o más síntomas mediados por células B neoplásicas. Así, por ejemplo, una mejora en la enfermedad puede caracterizarse como una respuesta completa. Por “respuesta completa” se quiere decir una ausencia de enfermedad clínicamente detectable, con la normalización de cualquier estudio radiográfico, de médula ósea y de fluido cefalorraquídeo (CSF) previamente anormales. Tal respuesta debe persistir durante al menos un mes tras el tratamiento según los procedimientos de la invención. Alternativamente, una mejora en la enfermedad puede ser categorizada como una respuesta parcial. Por “respuesta parcial” se quiere decir al menos aproximadamente un 50 % de disminución en toda la carga medible del tumor (es decir, el número de células tumorales presentes en el sujeto) en ausencia de nuevas lesiones y que persista durante al menos un mes. Tal respuesta es aplicable únicamente a los tumores medibles.

La respuesta del tumor puede ser evaluada buscando cambios en la morfología tumoral (es decir, la carga tumoral global, el tamaño del tumor y similares) usando técnicas de detección como el barrido de formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), la formación de imágenes por radiografía de rayos X, el barrido tomográfico computarizado (CT), la citometría de flujo o el análisis en clasificador celular activado por fluorescencia (FACS), la formación bioluminiscente de imágenes, por ejemplo la formación de imágenes mediante luciferasa, formación de imágenes de barrido óseo, muestreo por biopsia del tumor, incluyendo la aspiración de médula ósea (BMA). Además de estas respuestas terapéuticas positivas, el sujeto sometido a la terapia puede experimentar el efecto beneficioso de una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad. Así, para los tumores de células B, el sujeto puede experimentar una disminución de lo que ha dado en llamarse síntomas B, es decir, los sudores nocturnos, fiebre, pérdida de peso y/o urticaria.

Por “dosis terapéuticamente efectiva”, “cantidad terapéuticamente efectiva” o “cantidad efectiva” se quiere decir una cantidad del anticuerpo antagonista anti CD40 (o del fragmento del mismo de unión al antígeno) que, cuando se administra en combinación con una cantidad del anticuerpo anti CD20 (o del fragmento del mismo de unión al antígeno), produce una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento de un sujeto para un cáncer que comprende células B neoplásicas. En algunas realizaciones de la revelación, una dosis terapéuticamente efectiva, ya sea del anticuerpo anti CD20 (o del fragmento del mismo de unión al antígeno) o del anticuerpo antagonista anti CD40 (o del fragmento del mismo de unión al antígeno), está en el intervalo desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 40 mg/kg, desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 25 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg, desde aproximadamente 5 mg/kg hasta aproximadamente 15 mg/kg, o desde aproximadamente 7 mg/kg hasta aproximadamente 12 mg/kg. Se admite que el procedimiento del tratamiento puede comprender una única administración de una dosis terapéuticamente efectiva de la combinación de anticuerpos útil en la puesta en práctica de esta revelación, o administraciones múltiples de una dosis terapéuticamente efectiva de la combinación de anticuerpos.

Un procedimiento de predicción de la eficacia clínica es medir los efectos de la terapia de combinación con estos anticuerpos en un modelo adecuado; por ejemplo, el uso de la combinación de un anticuerpo anti CD20 y un anticuerpo antagonista anti CD40 en modelos de cáncer murino. Estos modelos incluyen los modelos de tumor de xenoinjerto en ratones lampiños, como los que usan las líneas celulares humanas del linfoma de Burkitt conocidas como Namalwa y Daudi. En algunas realizaciones, la actividad antitumoral es evaluada en un modelo en fases de tumor de xenoinjerto en ratones lampiños usando la línea celular de linfoma humano de Daudi. Una línea celular de modelo en fases de tumor de xenoinjerto en ratones lampiños es generalmente más efectiva para distinguir la eficacia terapéutica de un anticuerpo dado que un modelo sin fases, ya que en el modelo en fases la dosificación de anticuerpos se inicia únicamente después de que el tumor haya alcanzado un tamaño medible. En el modelo sin fases, la dosificación de anticuerpos se inicia generalmente en menos de aproximadamente 1 día de la inoculación del tumor y antes de que esté presente un tumor palpable. La capacidad de un anticuerpo de exhibir una actividad antitumoral aumentada en un modelo en fases es una clara indicación de que el anticuerpo será terapéuticamente efectivo.

Los procedimientos dados a conocer en el presente documento comprenden el uso de una terapia de combinación. El término “combinación” se usa en su sentido más amplio y significa que un sujeto es tratado con al menos dos regímenes terapéuticos. Así, “terapia de combinación de anticuerpos” significa que un sujeto es tratado con al menos dos regímenes de anticuerpos; más en particular, con al menos un anticuerpo anti CD20 (o un fragmento del mismo de unión al antígeno) en combinación con al menos un anticuerpo anti CD40 (o un fragmento del mismo de

unión de antígenos), pero el momento de administración de los diferentes regímenes de anticuerpos puede ser variado, con tal de que se logren los efectos beneficiosos de la combinación de estos anticuerpos. El tratamiento con un anticuerpo anti CD20 (o un fragmento del mismo de unión al antígeno) en combinación con un anticuerpo antagonista anti CD40 (o un fragmento del mismo de unión al antígeno) puede ser simultáneo (concurrente), consecutivo (secuencial) o una combinación de ambos. Por lo tanto, un sujeto que esté sometido a una terapia de combinación de anticuerpos puede recibir ambos anticuerpos a la vez (es decir, simultáneamente) o en momentos diferentes (es decir, secuencialmente, en cualquier orden, en el mismo día o en días diferentes), siempre que se provoque el efecto terapéutico de la combinación de ambas sustancias en el sujeto que está sometido a la terapia. En algunas realizaciones, la combinación de anticuerpos será dada simultáneamente para una dosificación, pero otras dosificaciones incluirán una administración secuencial, en cualquiera de los dos órdenes, en el mismo día o en días diferentes. La administración secuencial puede llevarse a cabo con independencia de si el sujeto responde a la administración del primer anticuerpo monoclonal. Cuando se administran simultáneamente los dos anticuerpos, pueden ser administrados como composiciones farmacéuticas separadas, comprendiendo cada una ya sea el anticuerpo anti CD20 (o el fragmento del mismo de unión al antígeno) o el anticuerpo antagonista anti CD40 (o el fragmento del mismo de unión al antígeno), o pueden ser administradas como una única composición farmacéutica que comprende estos dos agentes anticancerosos.

Además, el tratamiento puede lograrse con dosis variables, así como con regímenes de dosificación. En algunas realizaciones, la dosis de un anticuerpo monoclonal diferirá de la dosis administrada para el otro anticuerpo monoclonal, con la condición de que la combinación de estas dosis sea efectiva en el tratamiento de uno cualquiera o más de varios parámetros terapéuticos. Estos regímenes de tratamiento se basan en dosis y en programas de dosificación que maximizan los efectos terapéuticos, como los descritos más arriba. Los expertos en la técnica admiten que una dosis de un anticuerpo monoclonal cualquiera puede no ser terapéuticamente efectiva cuando se administra individualmente, pero será terapéuticamente efectiva cuando se administre en combinación con el otro anticuerpo. Véase, por ejemplo, la Figura 1, en la que un anticuerpo anti CD20 administrado por sí solo fue terapéuticamente inefectivo, mientras que el anticuerpo antagonista anti CD40 administrado por sí solo inhibió significativamente el crecimiento del xenoinjerto del linfoma humano resistente al rituximab. Cuando estos dos anticuerpos fueron administrados en combinación, se observó una actividad antitumoral sinérgica. Así, en algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente efectiva de una combinación de un anticuerpo anti CD20 y de un anticuerpo antagonista anti CD40 puede comprender dosis de agentes activos individuales que, cuando se administran solos, no serían terapéuticamente efectivos o serían menos terapéuticamente efectivos que cuando se administran en combinación mutua.

En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden ser administrados en cantidades equivalentes. Así, cuando se contempla un régimen de dosificación equivalente, el anticuerpo antagonista anti CD40, por ejemplo el anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR-12.12 o CHIR-5.9, es dosificado a aproximadamente 0,003 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg o 10 mg/kg, y el anticuerpo anti CD20, por ejemplo IDEC-C2B8 (Rituxan®) es también dosificado en la dosis equivalente de aproximadamente 0,003 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente. En otras realizaciones, estos anticuerpos pueden ser administrados en cantidades no equivalentes.

Los expertos en la técnica admiten que los procedimientos de terapia de combinación de anticuerpos dados a conocer en el presente documento pueden ser usados antes, después o en forma concurrente con otras formas de oncoterapia. Tal oncoterapia puede incluir regímenes de quimioterapia, como el tratamiento con CVP (ciclofosfamida, vincristina y prednisona), CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona), ICE (ifosfamida, carboplatino y etopósido), Mitoxantrona, Citarabina, DVP (daunorrubicina, prednisona y vincristina), ATRA (ácido holo-trans-retinoico), Idarrubicina, régimen de quimioterapia de Hoelzer, régimen de quimioterapia de La La, ABVD (adriamicina, bleomicina, vinblastina y dacarbacina), CEOP (ciclofosfamida, epirubicina, vincristina y prednisona), GEOP-BE (ciclofosfamida, epirubicina, vincristina, prednisona, bleomicina y etopósido), 2-CdA (2-clorodeoxiadenosina, 2-CdA), FLAG e IDA (fludarabina, citarabina e idarrubicina; con o sin tratamiento subsiguiente con G-CSF), VAD (vincristina, doxorubicina y dexametasona), M & P (melfalán y prednisona), Q semanal (ciclofosfamida y prednisona), ABCM (adriamicina (doxorubicina), BCNU, ciclofosfamida y melfalán), MOPP (mostaza de nitrógeno, oncovín, procarbina y prednisona) y DHAP (dexametasona, ara-C en dosis elevadas y platino). Alternativamente, tales oncoterapias pueden incluir un tratamiento con radiación, incluyendo las terapias mieloablativas. Así, los procedimientos dados a conocer en el presente documento encuentran uso como tratamiento concurrente para matar células tumorales residuales, ya sea *in vivo* o *ex vivo*, después de tales oncoterapias.

#### **Anticuerpos antagonistas anti CD40**

Los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR 12.12 representan anticuerpos antagonistas anti CD40 adecuados para su uso en los procedimientos dados a conocer en el presente documento. Los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 son anticuerpos monoclonales anti CD40 totalmente humanos del isotipo IgG<sub>1</sub> producidos a partir de las líneas celulares de hibridoma 131.2F8.5.9 (a la que se hace referencia en el presente documento como la línea celular 5.9) y 153.8E2.D10.D6.12.12 (a la que se hace referencia en el presente documento como la línea celular 12.12). Estas líneas celulares se crearon usando esplenocitos de ratones xenotípicos inmunizados que contienen el *locus* de la

cadena pesada de la IgG<sub>1</sub> humana y el locus de la cadena κ humana (Abgenix). Las células del bazo se fusionaron con las células de mieloma SP2/0 de ratón (Sierra BioSource). Los hibridomas resultantes se subclonaron varias veces para crear las líneas celulares monoclonales estables 5.9 y 12.12. Otros anticuerpos de la invención pueden prepararse de manera similar usando ratones transgénicos para *loci* de inmunoglobulina humana o por otros procedimientos conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento.

Las secuencias de aminoácidos para las regiones delantera, variable y constante para la cadena ligera y la cadena pesada del mAb CHIR-12.12 son presentadas en el presente documento en las Figuras 2A y 2B, respectivamente. Véanse también la SEC ID n° 2 (secuencia completa de la cadena ligera del mAb CHIR-12.12), la SEC ID n° 4 (secuencia completa de la cadena pesada del mAb CHIR-12.12) y la SEC ID n° 5 (secuencia completa de una variante de la cadena pesada del mAb CHIR-12.12 presentada en la SEC ID n° 4 en la que la variante comprende una sustitución del residuo de alanina por serina en la posición 153 de la SEC ID n° 4). Las secuencias de nucleótidos que codifican la cadena ligera y la cadena pesada del mAb CHIR-12.12 son presentadas en el presente documento en las Figuras 3A y 3B, respectivamente. Véanse también la SEC ID n° 1 (secuencia de codificación de la cadena ligera del mAb CHIR-12.12), y la SEC ID n° 3 (secuencia de codificación de la cadena pesada del mAb CHIR 12.12). Las secuencias de aminoácidos para las regiones delantera, variable y constante para la cadena ligera y la cadena pesada del mAb CHIR-5.9 son presentadas en el presente documento en las Figuras 4A y 4B, respectivamente. Véanse también la SEC ID n° 6 (secuencia completa de la cadena ligera del mAb CHIR-5.9), la SEC ID n° 7 (secuencia completa de la cadena pesada del mAb CHIR-5.9) y la SEC ID n° 8 (secuencia completa de una variante de la cadena pesada del mAb CHIR-5.9 presentada en la SEC ID n° 7 en la que la variante comprende una sustitución del residuo de alanina por serina en la posición 158 de la SEC ID n° 7). Además, los hibridomas que expresan los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 han sido depositados en la ATCC con designaciones de Depósito de Patente PTA-5542 y PTA-5543, respectivamente.

Además de la actividad antagonista, los anticuerpos anti CD40 pueden tener otro mecanismo de acción contra una célula tumoral. Por ejemplo, los anticuerpos nativos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 tienen actividad ADCC. Como alternativa, las regiones variables de los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 pueden expresarse en otro isotipo de anticuerpos que tenga actividad ADCC. También es posible conjugar formas nativas, formas recombinantes o fragmentos de CHR-5.9 o CHIR-12.12 de unión al antígeno con una citotoxina, un agente terapéutico, o a un radioisótopo.

Los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 se unen a CD40 soluble en ensayos de tipo ELISA, evitan la unión del ligando de CD40 al CD40 de la superficie celular, y desplazan el ligando de CD40 previamente unido, según se determina por ensayos de citometría de flujo. Los anticuerpos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 compiten entre sí por la unión a CD40 pero no con 15B8, el anticuerpo monoclonal anti CD40 descrito en el documento WO 02/28904, Solicitud Internacional n° PCT/US01/30857, publicado como WO 02/28904, también titulado "Human Anti CD40 Antibodies", presentado el 2 de octubre de 2001 (Expediente de agente n° PP16092.003). Cuando se prueban *in vitro* los efectos sobre la proliferación de células B de sujetos humanos normales, CHIR-5.9 y CHIR-12.12 actúan como anticuerpos antagonistas anti CD40. Además, CHIR-5.9 y CHIR-12.12 no inducen una proliferación intensa de linfocitos humanos de sujetos normales. Estos anticuerpos son capaces de matar las células diana que expresan CD40 por citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). La afinidad de unión del CHIR-5.9 por el CD40 humano es de  $1,2 \times 10^{-8}$  M y la afinidad de unión del CHIR-12.12 es de  $5 \times 10^{-10}$  M, según se determina por medio del ensayo Biacore™.

Los anticuerpos antagonistas anti CD40 adecuados para uso en los procedimientos dados a conocer en el presente documento presentan una fuerte afinidad de unión de sitio único por el antígeno CD40 de superficie celular. Los anticuerpos monoclonales dados a conocer en el presente documento presentan una constante de equilibrio de disociación ( $K_D$ ) para el CD40 de al menos  $10^{-5}$  M, al menos  $3 \times 10^{-5}$  M, preferentemente al menos  $10^{-6}$  M hasta  $10^{-7}$  M, más preferentemente al menos  $10^{-8}$  M hasta aproximadamente  $10^{-12}$  M, medida usando un ensayo estándar tal como Biacore™. El análisis Biacore se conoce en la técnica y se proporcionan detalles en el "BIAapplications handbook". Los procedimientos descritos en el documento WO 01/27160 pueden usarse para modular la afinidad de unión.

Se entiende por "antígeno CD40", "antígeno CD40 de superficie celular", "receptor de CD40" o "CD40" una glicoproteína transmembranaria que pertenece a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) (véanse, por ejemplo las Patentes estadounidenses n°s 5.674.492 y 4.708.871; Stamenkovic et al. (1989) EMBO 8: 1403; Clark (1990) Tissue Antigens 36:33; Barclay et al. (1997) The Leucocyte Antigen Facts Book (2ª ed.; Academic Press, San Diego)). Se han identificado dos isoformas de CD40 humano, codificadas por variantes de transcripción con cortes y empalmes alternativos de este gen. La primera isoforma (también conocida como la "isoforma larga" o "isoforma 1") se expresa como un polipéptido precursor de 277 aminoácidos (SEC ID n° 12 (documentada en primer lugar en GenBank con el n° de acceso CAA43045, e identificada como isoforma 1 en GenBank con n° de acceso NP\_001241), codificado por la SEC ID n° 11 (véanse los n°s de acceso de GenBank X60592 y NM\_001250)), que tiene una secuencia señal representada por los primeros 19 residuos. La segunda isoforma (también conocida como la "isoforma corta" o "isoforma 2") se expresa como un polipéptido precursor de 203 aminoácidos (SEC ID n° 10 (n° de acceso de GenBank NP\_690593), codificado por la SEC ID n° 9 (n° de acceso de GenBank NM\_152854)), que también tiene una secuencia señal representada por los primeros 19 residuos. Los polipéptidos precursores de estas

dos isoformas de CD40 humano comparten en común sus primeros 165 residuos (es decir, los residuos 1-165 de la SEC ID nº 10 y la SEC ID nº 12). El polipéptido precursor de la isoforma corta (mostrado en SEC ID nº 10) está codificado por una variante de transcripción (SEC ID nº 9) que carece de un segmento codificador, lo que da lugar a un cambio del marco de traducción; la isoforma de CD40 resultante contiene un extremo C terminal más corto y diferenciado (residuos 166-203 de SEC ID nº 10) del que está contenido en la isoforma larga de CD40 (extremo C terminal mostrado en los residuos 166-277 de SEC ID nº 12). Para los fines de la presente revelación, las expresiones “antígeno CD40”, “antígeno CD40 de superficie celular”, “receptor de CD40” o “CD40” abarcan tanto la isoforma corta como la larga de CD40. Los anticuerpos anti CD40 dados a conocer en el presente documento se unen a un epítipo del CD40 humano que se encuentra en la misma situación dentro de la isoforma corta o la isoforma larga de este antígeno de superficie celular, tal como se hace notar a continuación en el presente documento.

El antígeno CD40 está expuesto en la superficie de una diversidad de tipos celulares, según se describe en otras partes en el presente documento. Por “expuesto en la superficie” y “expresado en la superficie” se entiende que todo o una porción del antígeno CD40 está expuesto al exterior de la célula. El antígeno CD40 expuesto o expresado puede estar total o parcialmente glicosilado.

Por “actividad agonista” se entiende que la sustancia funciona como un agonista. Un agonista se combina con un receptor análogo en una célula e inicia una reacción o actividad que es similar a la misma que es iniciada por el ligando natural del receptor; por ejemplo, transduce una señal a la célula. Un agonista de CD40 induce, sin limitación, cualquiera o todas las respuestas siguientes: proliferación y diferenciación de células B, producción de anticuerpos, adhesión intercelular, generación de memoria de células B, cambio de isotipo, regulación ascendente de la expresión en la superficie celular de MHC clase II y CD80/86, y secreción de citoquinas proinflamatorias tales como IL-8, IL-12 y TNF. Por “actividad antagonista” se entiende que la sustancia funciona como un antagonista. Un antagonista de CD40 evita o reduce la inducción de cualquiera de las respuestas inducidas por la unión del receptor de CD40 a un ligando agonista, en particular CD40L. El antagonista puede reducir la inducción de una o más de las respuestas a la unión de agonistas en un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, preferentemente un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, más preferentemente un 70 %, 80 %, 85 % y más preferentemente aún un 90 %, 95 %, 99 % o el 100 %. Los procedimientos para medir la especificidad de unión y la actividad de antagonista de anticuerpos anti CD40 y ligandos de CD40 son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, sin limitación, ensayos estándar de unión competitiva, ensayos para monitorizar la secreción de inmunoglobulinas por las células B, ensayos de proliferación de células B, ensayos de proliferación de células B de tipo Banchereau, ensayos de células T cooperadoras para la producción de anticuerpos, ensayos de proliferación de células B con coestimulación y ensayos para regulación ascendente de marcadores de activación de células B. Véanse, por ejemplo, los ensayos dados a conocer en el documento WO 00/75348 y en la patente estadounidense nº 6.087.329.

Por actividad agonista “significativa” se entiende una actividad agonista de al menos el 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % superior a la actividad agonista inducida por una sustancia neutra o un control negativo según se mide en el ensayo de una respuesta de células B. Preferentemente, la actividad agonista “significativa” es una actividad agonista que es al menos 2 veces mayor o al menos 3 veces mayor que la actividad agonista inducida por una sustancia neutra o un control negativo según se mide en el ensayo de una respuesta de células B. Así, por ejemplo, cuando la respuesta de células B de interés es la proliferación de células B, la actividad agonista “significativa” sería la inducción de un nivel de proliferación de células B que es al menos 2 veces mayor o al menos 3 veces mayor que el nivel de proliferación de células B inducido por una sustancia neutra o un control negativo. En una realización, una inmunoglobulina no específica, por ejemplo la IgG1, que no se une con el CD40, sirve de control negativo. Una sustancia “libre de actividad agonista significativa” presentaría una actividad agonista no más del 25 % mayor que la actividad agonista inducida por una sustancia neutra o un control negativo, preferentemente no más de aproximadamente un 25 % mayor que la actividad agonista inducida por una sustancia neutra o un control negativo, preferentemente no más de aproximadamente un 20 % mayor, 15 % mayor, 10 % mayor, 5 % mayor, 1 % mayor, 0,5 % mayor o incluso no más de aproximadamente un 0,1 % mayor que la actividad agonista inducida por una sustancia neutra o un control negativo según se mide en el ensayo de una respuesta de células B. Los anticuerpos antagonistas anti CD40 útiles en los procedimientos dados a conocer en el presente documento están libres de una actividad agonista significativa, según se ha hecho notar más arriba, cuando están unidos a un antígeno CD40 en una célula humana. En una realización de la revelación, el anticuerpo antagonista anti CD40 está libre de actividad agonista significativa en una respuesta de células B. En otra realización de la revelación, el anticuerpo antagonista anti CD40 está libre de una actividad agonista significativa en ensayos de más de una respuesta de células B (por ejemplo, proliferación y diferenciación, o proliferación, diferenciación y producción de anticuerpos).

En la técnica se conocen anticuerpos monoclonales del CD40. Véanse, por ejemplo, las secciones dedicadas al antígeno de células B en McMichael, ed. (1987; 1989) *Leukocyte Typing III and IV* (Oxford University Press, Nueva York); las patentes estadounidenses nºs 5.674.492, 5.874.082, 5.677.165, 6.456.959; el documento WO 00/63395; los nos de Publicación Internacional WO 02/28905 y WO 02/28904; Gordon et al. (1988) *J. Immunol.* 140:1425; Valle et al. (1989) *Eur. J. Immunol.* 19:1463; Clark et al. (1986) *PNAS* 83:4494; Paulie et al. (1989) *J. Immunol.* 142:590; Gordon et al. (1987) *Eur. J. Immunol.* 17:1535; Jabara et al. (1990) *J. Exp. Med.* 172:1861; Zhang et al. (1991) *J. Immunol.* 146:1836; Gascan et al. (1991) *J. Immunol.* 147:8; Banchereau et al. (1991) *Clin. Immunol. Spectrum* 3:8;

y Bancheau et al. (1991) Science 251:70. De particular interés para la presente revelación son los anticuerpos antagonistas anti CD40 dados a conocer en el presente documento que comparten las características de unión de los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos más arriba. Tales anticuerpos incluyen, sin limitación: (1) los anticuerpos monoclonales producidos por las líneas celulares de hibridoma designadas 131.2F8.5.9 (a la que se hace referencia en el presente documento como línea celular 5.9) y 153.8E2.D10.D6.12.12 (a la que se hace referencia en el presente documento como línea celular 12.12), depositadas en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5542 y Depósito de Patente nº PTA-5543, respectivamente; (2) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia mostrada en la SEC ID nº 2, la secuencia mostrada en la SEC ID nº 4, la secuencia mostrada en la SEC ID nº 5, la secuencia mostrada tanto en la SEC ID nº 2 como en la SEC ID nº 4, y la secuencia mostrada tanto en la SEC ID nº 2 como en la SEC ID nº 5; (3) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia mostrada en la SEC ID nº 6, la secuencia mostrada en la SEC ID nº 7, la secuencia mostrada en la SEC ID nº 8, la secuencia mostrada tanto en la SEC ID nº 6 como en la SEC ID nº 7, y la secuencia mostrada tanto en la SEC ID nº 6 como en la SEC ID nº 8; (4) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo constituido por la secuencia mostrada en la SEC ID nº 1, la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID nº 3, y la secuencia mostrada tanto en la SEC ID nº 1 como en la SEC ID nº 3; (5) un anticuerpo monoclonal que se une con un epítipo capaz de unirse con el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 5.9 o línea celular de hibridoma 12.12; (6) un anticuerpo monoclonal que se une con un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID nº 10 o en la SEC ID nº 12; (7) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 o CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitiva; y (8) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9 de unión al antígeno o de los anticuerpos monoclonales anteriores en los elementos precedentes (1)-(7), en los que el fragmento retiene la capacidad de unirse específicamente con el antígeno CD40 humano.

### **Anticuerpos anti CD20**

Por "antígeno CD20" se entiende una proteína transmembranaria no glicosilada de 33-37 kDa que se expresa en células B comprometidas al linaje de la fase previa a las células B a la fase linfoblástica de las células B (nº de acceso de GenBank X12530; Barclay et al. (1997) The Leucocyte Antigen Facts Book (2ª ed.; Academic Press, San Diego)). El receptor CD20 es expuesto en la superficie de los tipos de células B, tal como se describe en otro lugar del presente documento. Por "expuesto en la superficie" y "expresado en la superficie" se entiende que todo o una porción del antígeno CD20 está expuesto al exterior de la célula.

En la técnica se conocen anticuerpos anti CD20. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses nºs 5.595.721, 6.399.061 y 6.455.043. Los anticuerpos anti CD20 humanos y quiméricos son particularmente útiles en la puesta en práctica de los procedimientos de la invención. Ejemplos de anticuerpos anti CD20 quiméricos incluyen, sin limitación, el IDEC-C2B8, disponible comercialmente con el nombre de Rituxan® (IDEC Pharmaceuticals Corp., San Diego, California) y descrito en las patentes estadounidenses nºs 5.736.137, 5.776.456 y 5.843.439; los anticuerpos quiméricos descritos en la patente estadounidense nº 5.750.105; y los anticuerpos descritos en las patentes estadounidenses nºs 5.500.362, 5.677.180, 5.721.108 y 5.843.685. Los anticuerpos anti CD20 de origen murino también son adecuados para su uso en los procedimientos dados a conocer en el presente documento. Ejemplos de tales anticuerpos murinos anti CD20 incluyen, sin limitación, el anticuerpo B 1 (descrito en la patente estadounidense nº 6.015.542); el anticuerpo IF5 (véase Press et al. (1989) J. Clin. Oncol. 7:1027); los anticuerpos anti CD20 NKI-B20 y BCA-B20 (descritos en Hooijberg et al. (1995) Cancer Research 55:840-846); y el EDEC-2BB (disponible comercialmente en IDEC Pharmaceuticals Corp., San Diego, California); el anticuerpo 2H7 (descrito en Clark et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1766-1770); y otros descritos en Clark et al. (1985) *supra* y Stashenko et al. (1980) J. Immunol. 125:1618-1685.

### **Producción de anticuerpos anti CD20 y anti CD40**

Los anticuerpos anti CD40 y los anticuerpos anti CD20 para el uso en los procedimientos dados a conocer en el presente documento pueden ser producidos usando cualquiera de los procedimientos bien conocidos para los expertos en la técnica. Pueden prepararse sueros policlonales por medio de procedimientos convencionales. En general, se usa en primer lugar una solución que contiene el antígeno CD40 o CD20 para inmunizar un animal adecuado, preferentemente un ratón, una rata, un conejo o una cabra. Se prefieren los conejos o las cabras para la preparación de sueros policlonales debido al volumen de suero que puede obtenerse y la disponibilidad de anticuerpos anticonejo y anticabra marcados.

Los sueros policlonales pueden prepararse en un animal transgénico, preferentemente un ratón que porte *loci* de inmunoglobulina humana. En una realización preferente, se usan como inmunógen células Sf 9 que expresan CD40 o CD20. La inmunización también puede llevarse a cabo mezclando o emulsionando la solución que contiene el antígeno en suero fisiológico, preferentemente en un adyuvante como el adyuvante completo de Freund, e inyectando la mezcla o emulsión parenteralmente (generalmente de forma subcutánea o intramuscular). Normalmente, es suficiente una dosis de 50-200 µg/inyección. Generalmente, la se refuerza 2-6 semanas después



con una o más inyecciones de la proteína en suero fisiológico, preferentemente usando el adyuvante incompleto de Freund. Alternativamente, se pueden generar anticuerpos por medio de una inmunización *in vitro* usando procedimientos conocidos en la técnica, lo que, para los fines de esta revelación, se considera equivalente a la inmunización *in vivo*. Los antisueros policlonales se obtienen sangrando al animal inmunizado y recogiendo la sangre en un recipiente de vidrio o de plástico, incubando la sangre a 25°C durante una hora, seguida por la incubación a 4°C durante 2-18 horas. El suero se recupera por centrifugación (por ejemplo, a 1.000 × g durante 10 minutos). De los conejos pueden obtenerse aproximadamente 20-50 ml por sangrado.

La producción de las células Sf 9 (*Spodoptera frugiperda*) se da a conocer en la patente estadounidense nº 6.004.552. Brevemente, se recombinaron secuencias que codifican el CD40 humano en un baculovirus usando vectores de transferencia. Los plásmidos fueron cotransfectados con ADN de baculovirus de tipo de salvaje en células Sf 9. Se identificaron las células Sf 9 recombinantes infectadas con baculovirus y se purificaron por clonación.

Preferentemente, el anticuerpo es de naturaleza monoclonal. Los anticuerpos monoclonales son sumamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico; es decir, el antígeno CD40 o CD20 de la superficie celular. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales), que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal es dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. El modificador "monoclonal" indica del carácter del anticuerpo que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, como los producidos por una población clonal de células B, y no debe interpretarse que requiera la producción del anticuerpo por ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que hayan de usarse según la presente revelación pueden ser creados por el procedimiento del hibridoma, descrito por primera vez por Kohler et al. (1975) Nature 256:495, o pueden ser creados por medio de procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente estadounidense nº 4.816.567). Los anticuerpos monoclonales también puede ser aislados de las bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas, por ejemplo, en Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628; Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597; y en la patente estadounidense nº 5.514.548.

Por "epítopo" se entiende la parte de una molécula antigénica para la cual se produce un anticuerpo y a la que se unirá el anticuerpo. Los epítomos pueden comprender residuos lineales de aminoácidos (es decir, los residuos dentro del epítopo están dispuestos secuencialmente uno tras otro de manera lineal), residuos no lineales de aminoácidos (a los que se denomina "epítomos no lineales" en el presente documento; estos epítomos no están dispuestos secuencialmente), o residuos tanto lineales como no lineales de aminoácidos.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando el procedimiento de Kohler et al. (1975) Nature 256:495-496 o una modificación del mismo. Normalmente, se inmuniza un ratón con una solución que contiene un antígeno. La inmunización puede llevarse a cabo mezclando o emulsionando en suero fisiológico la solución que contiene el antígeno, preferentemente en un adyuvante como el adyuvante completo de Freund, e inyectando parenteralmente la mezcla o emulsión. Para obtener los anticuerpos monoclonales de la revelación puede usarse cualquier procedimiento de inmunización conocido en la técnica. Después de la inmunización del animal, se elimina el bazo (y, opcionalmente, varios ganglios linfáticos) y se lo disocia en células individuales. Las células del bazo pueden ser investigadas aplicando una suspensión celular a una placa o un pocillo recubiertos con el antígeno de interés. Las células B que expresan una inmunoglobulina unida a la membrana específica para el antígeno se unen a la placa y no desaparecen al enjuagar. Las células B resultantes, o todas las células de bazo disociadas, son inducidas a continuación a fusionarse con células de mieloma para formar hibridomas y son cultivadas en un medio selectivo. Las células resultantes son puestas en placas por medio de dilución en serie y son sometidas a ensayo en busca de la producción de anticuerpos que se unen específicamente con el antígeno de interés (y que no se unen a antígenos no relacionados). Los hibridomas seleccionados que segregan el anticuerpo monoclonal (mAb) son cultivados entonces, ya sea *in vitro* (por ejemplo, botellas de cultivo tisular o reactores de fibras huecas), o *in vivo* (como ascitis en ratones).

Cuando los anticuerpos antagonistas anti CD40 de la revelación deban prepararse usando procedimientos de ADN recombinante, el ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y se secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma descritas en el presente documento sirven de fuente preferente de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede ponerse en vectores de expresión, que son transfectados entonces a células anfitrionas, como células de *E. coli*, células COS simiescas, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen la proteína hemoglobina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células anfitrionas recombinantes. Los artículos con reseñas sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra et al. (1993) Curr. Opin. Immunol. 5:256 y Phickthun (1992) Immunol. Revs. 130:151. Como alternativa al uso de hibridomas, el anticuerpo se puede producir en una línea celular tal como una línea de células CHO, como se da a conocer en las patentes estadounidenses nºs 5.545.403, 5.545.405 y 5.998.144. En resumen, la línea celular se transfecta con vectores capaces de expresar una cadena ligera y una cadena pesada, respectivamente. Transfectando las dos proteínas en vectores separados, pueden producirse anticuerpos quiméricos. Otra ventaja es la glicosilación correcta del anticuerpo.

En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti CD40, por ejemplo, el anticuerpo CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o el fragmento del mismo de unión al antígeno son producidos en células CHO usando el sistema GS de expresión de genes (Lonza Biologics, Portsmouth, Nueva Hampshire), que usa glutamina sintetasa como marcador. Véanse también las patentes estadounidenses n<sup>os</sup> 5.122.464, 5.591.639, 5.658.759, 5.770.359, 5.827.739, 5.879.936, 5.891.693 y 5.981.216.

La expresión "epitopo del antígeno CD40", según se usa en el presente documento, se refiere a una estructura molecular tridimensional (bien lineal o conformacional) que es capaz de tener inmunorreactividad con un anticuerpo monoclonal anti CD40 o un anticuerpo monoclonal anti CD20. Los epítopos de antígenos pueden comprender proteínas, fragmentos de proteínas, péptidos, hidratos de carbono, lípidos y otras moléculas, pero, para los fines de la presente invención, lo más común es que sean proteínas, oligopéptidos cortos, miméticos de oligopéptidos (es decir, compuestos orgánicos que imitan las propiedades de unión al anticuerpo del antígeno CD40 o CD20), o combinaciones de los mismos. Los miméticos de oligopéptidos adecuados se describen, entre otros, en la solicitud de PCT US 91/04282.

Además, la expresión "anticuerpo", según se usa en el presente documento, abarca anticuerpos quiméricos anti CD40 o anticuerpos anti CD20. Los anticuerpos quiméricos anti CD40 para uso en los procedimientos dados a conocer en el presente documento tienen las características de unión de los anticuerpos monoclonales anti CD40 CHIR-5.9 o CHIR-12.12, mientras que los anticuerpos quiméricos anti CD20 para uso en los procedimientos dados a conocer en el presente documento tienen las características de unión del anticuerpo monoclonal anti CD20 IDEC-C2B8. Por anticuerpos "quiméricos" se entiende anticuerpos que, más preferentemente, se obtienen usando técnicas de ácido desoxirribonucleico recombinante y que comprenden tanto componentes humanos (incluidas especies inmunológicamente "relacionadas", por ejemplo, el chimpancé) como no humanos. Así, lo más preferente es que la región constante del anticuerpo quimérico sea sustancialmente idéntica a la región constante de un anticuerpo natural humano; lo más preferente es que la región variable del anticuerpo quimérico se obtenga de una fuente no humana y tenga la especificidad antigénica deseada para el antígeno CD40 o CD20 de superficie celular. La fuente no humana puede ser cualquier fuente de vertebrado que pueda usarse para generar anticuerpos contra un antígeno CD40 o CD20 humano de superficie celular o material que comprenda un antígeno CD40 o CD20 humano de superficie celular. Tales fuentes no humanas incluyen, sin limitación, roedores (por ejemplo, conejo, rata, ratón, etc.; véase, por ejemplo, la patente estadounidense n<sup>o</sup> 4.816.567) y primates no humanos (por ejemplo, mono del Viejo Mundo, simio, etc.; véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n<sup>os</sup> 5.750.105 y 5.756.096). Según se usa en el presente documento, la frase "inmunológicamente activo", cuando se usa en referencia a anticuerpos anti CD40 quiméricos, significa un anticuerpo quimérico que se une a CD40 humano o, cuando se usa en referencia a anticuerpos anti CD20 quiméricos, significa un anticuerpo quimérico que se une a CD20 humano.

Los anticuerpos anti CD40 y los anticuerpos anti CD 20 humanizados representan anticuerpos anti CD40 y anticuerpos anti CD20 adicionales adecuados para su uso en los procedimientos dados a conocer en el presente documento. Por "humanizado" se entienden formas de anticuerpos anti CD40 o anticuerpos anti CD20 que contienen una secuencia mínima derivada de secuencias de inmunoglobulinas no humanas. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que están reemplazados residuos de una región hipervariable (también conocida como región determinante de complementariedad o CDR) del receptor por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas. La expresión "región determinante de complementariedad" se refiere a las secuencias de aminoácidos que, juntas, definen la afinidad y especificidad de unión de la región Fv natural de un sitio de unión de inmunoglobulina nativa. Véanse, por ejemplo, Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917; Kabat et al. (1991) U.S. Dept of Health and Human Services, Publicación NIH N<sup>o</sup> 91-3242). La expresión "región constante" se refiere a la porción de la molécula del anticuerpo que confiere funciones de efector. En trabajos anteriores dirigidos a la producción de anticuerpos no inmunogénicos para uso en terapia de enfermedades humanas, se sustituyeron regiones constantes de ratón por regiones constantes humanas. Las regiones constantes de los presentes anticuerpos humanizados se obtuvieron de inmunoglobulinas humanas. Sin embargo, estos anticuerpos humanizados provocaron aún una respuesta inmune no deseada y potencialmente peligrosa en seres humanos y hubo pérdida de afinidad. Los anticuerpos anti CD40 humanizados para uso en los procedimientos dados a conocer en el presente documento tienen características de unión similares a las exhibidas por los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 y CHIR-12.12 descritos en el presente documento. Los anticuerpos anti CD20 humanizados para uso en los procedimientos dados a conocer en el presente documento tienen características de unión similares a las exhibidas por el anticuerpo monoclonal IDEC-C2B8 descrito en el presente documento.

La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones et al. (1986) Nature 321: 522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332: 323-327; Verhoeven et al. (1988) Science 239: 1534-1536), sustituyendo secuencias de un anticuerpo humano por las correspondientes CDR o secuencias CDR de roedores o roedores mutantes. Véanse también las patentes estadounidenses n<sup>os</sup> 5.225.539, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762, 5.859.205. En algunos casos, los residuos dentro de las regiones marco de una o más regiones variables de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes residuos no humanos (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n<sup>os</sup> 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 6.180.370). Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo

donante. Estas modificaciones se realizan para refinar más el rendimiento del anticuerpo (por ejemplo, para obtener la afinidad deseada). En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos un dominio variable, y normalmente dos, en la que todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse Jones et al. (1986) Nature 331: 522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332: 323-329; y Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" pueden incluir anticuerpos en los que sustancialmente menos de un dominio variable intacto humano se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos del marco están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n<sup>os</sup> 5.225.539, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762, 5.859.205. Véanse también la patente estadounidense n<sup>o</sup> 6.180.370, y la Publicación Internacional WO 01/27160, en los que se dan a conocer anticuerpos humanizados y técnicas para producir anticuerpos humanizados que tienen mejor afinidad para un antígeno predeterminado.

También están abarcados por las expresiones anticuerpos anti CD40 o anticuerpos anti CD20 los anticuerpos anti CD40 o los anticuerpos anti CD20 xenogénicos o modificados producidos en un anfitrión mamífero no humano, más particularmente un ratón transgénico, caracterizados por *loci* de inmunoglobulina (Ig) endógena inactivados. En tales animales transgénicos, los genes endógenos competentes para la expresión de las subunidades ligera y pesada de las inmunoglobulinas del anfitrión se convierten en no funcionales y se sustituyen con los *loci* análogos de inmunoglobulina humana. Estos animales transgénicos producen anticuerpos humanos en ausencia sustancial de subunidades ligera o pesada de inmunoglobulina del anfitrión. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n<sup>os</sup> 5.877.397 y 5.939.598.

Preferentemente, los anticuerpos plenamente humanos contra CD40 y CD20 se obtienen inmunizando ratones transgénicos. Uno ratón tal se obtiene usando la tecnología XenoMouse® (Abgenix; Fremont, California), y se da a conocer en las patentes estadounidenses n<sup>os</sup> 6.075.181, 6.091.001 y 6.114.598. Para producir los anticuerpos que se dan a conocer en el presente documento, pueden inmunizarse ratones transgénicos para el *locus* de cadena pesada de IgG1 humana y el *locus* de cadena ligera  $\kappa$  humana con células Sf9 que expresan CD40 humano o CD20 humano. Los ratones también pueden ser transgénicos para otros isotipos. Los anticuerpos plenamente humanos útiles en los procedimientos dados a conocer en el presente documento se caracterizan por tener propiedades de unión similares a las exhibidas por los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9, CHIR-12.12 e IDEC-C2B8.

Los fragmentos de los anticuerpos anti CD40 o de los anticuerpos anti CD20 son adecuados para uso en los procedimientos dados a conocer en el presente documento siempre que retengan la afinidad deseada del anticuerpo de longitud completa. Por consiguiente, un fragmento de un anticuerpo anti CD40 retendrá la capacidad para unirse al antígeno CD40 de la superficie de las células B, y un fragmento de un anticuerpo anti CD20 retendrá la capacidad para unirse al antígeno CD20 de la superficie de las células B, respectivamente. Tales fragmentos se caracterizan por tener propiedades similares al anticuerpo correspondiente de longitud completa. Por ejemplo, los fragmentos del anticuerpo antagonista anti CD40 se unirán específicamente a un antígeno CD40 humano expresado en la superficie de una célula humana, y están libres de actividad agonista significativa, pero exhiben actividad antagonista cuando se unen a un antígeno CD40 en una célula humana que expresa CD40; mientras que los fragmentos del anticuerpo anti CD20 se unirán específicamente al CD20. En el presente documento se hace referencia a tales fragmentos como fragmentos "de unión al antígeno".

Los fragmentos adecuados de un anticuerpo que se unen a antígenos comprenden una parte de un anticuerpo de longitud completa, por lo general la región de unión al antígeno o una de sus regiones variables. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, sin limitación, fragmentos Fab, F(ab')<sub>2</sub> y Fv y moléculas de anticuerpos monocatenarios. Por "Fab" se entiende un fragmento monovalente de una inmunoglobulina que se une al antígeno que está compuesto por la cadena ligera y parte de la cadena pesada. Por F(ab')<sub>2</sub> se entiende un fragmento bivalente de una inmunoglobulina que se une al antígeno que contiene ambas cadenas ligeras y parte de ambas cadenas pesadas. Por fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenario" o "sFv" se entiende fragmentos que comprenden los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una cadena polipeptídica simple. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n<sup>os</sup> 4.946.778, 5.260.203, 5.455.030 y 5.856.456. Por lo general, el polipéptido Fv comprende además un conector de polipéptido entre los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que permite al sFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una reseña de sFv véase Pluckthun (1994) en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, ed. Rosenberg y Moore (Springer-Verlag, Nueva York), páginas 269-315.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos generadas usando las técnicas descritas en, por ejemplo, McCafferty et al. (1990) Nature 348: 552-554 (1990) y en la patente estadounidense n<sup>o</sup> 5.514.548. Clackson et al. (1991) Nature 352: 624-628 y Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222: 581-597 describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (del orden de nM) por

mezcla aleatoria de cadenas (Marks et al. (1992) *Biol/Technology* 10:779-783), así como por infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse et al. (1993) *Nucleic, Acids Res.* 21: 2265-2266). Por consiguiente, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridomas de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

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

15 Combinaciones de anticuerpos útiles en los procedimientos dados a conocer en el presente documento incluyen anticuerpos monoclonales antagonistas anti CD 40 CHIR-5.9 y CHIR 12.12, dados a conocer en el presente documento, así como los anticuerpos anti CD20, como el IDEC-C2B8, que difieren en las regiones que no son CDR; y los anticuerpos con una o más adiciones, deleciones o sustituciones. La revelación también abarca anticuerpos anti CD20 y anticuerpos antagonistas anti CD40 desinmunizados, que pueden producirse como se describe, por ejemplo, en los documentos de Publicación Internacional n<sup>os</sup> WO 98/52976 y WO 0034317. De esta manera, los residuos dentro de los anticuerpos útiles para poner en práctica los procedimientos dados a conocer en el presente documento se modifican para convertir a los anticuerpos en no inmunogénicos o menos inmunogénicos para los seres humanos manteniendo al mismo tiempo su especificidad de unión y su actividad biológica, en los que tal actividad se mide por medio de los ensayos señalados en otra parte del presente documento. También se incluyen en la revelación las proteínas de fusión que comprenden anticuerpos anti CD20 o anticuerpos antagonistas anti CD40, o un fragmento de los mismos, proteínas de fusión que pueden sintetizarse o expresarse a partir de los correspondientes vectores de polinucleótidos, como se conoce en la técnica. Tales proteínas de fusión se describen con referencia a la conjugación de anticuerpos como se hace notar más abajo.

20 Los anticuerpos útiles en la puesta en práctica de los procedimientos dados a conocer en el presente documento pueden tener variaciones de secuencia producidas usando los procedimientos descritos, por ejemplo, en los documentos de Publicación de Patente n<sup>os</sup> EP 0 983 303 A1, WO 00/34317 y WO 98/52976. Por ejemplo, se ha mostrado que las secuencias dentro de la CDR pueden provocar que un anticuerpo se una a MHC Clase II y desencadenar una respuesta no deseada de células T cooperadoras. Una sustitución conservadora puede permitir que el anticuerpo retenga la actividad de unión y pierda, no obstante, su capacidad para desencadenar una respuesta no deseada de células T. Cualquiera de tales sustituciones conservadoras o no conservadoras puede realizarse usando procedimientos reconocidos en la técnica, tales como los señalados en otra parte del presente documento. Los anticuerpos variantes pueden probarse de manera rutinaria para verificar su actividad antagonista, su afinidad y su especificidad usando los procedimientos descritos en el presente documento.

30 Un anticuerpo antagonista anti CD40 producido por cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, o cualquier otro procedimiento no dado a conocer en el presente documento, será útil según la presente revelación si posee al menos una de las siguientes actividades biológicas: inhibición de la secreción de inmunoglobulinas por las células B periféricas humanas normales estimuladas por células T; inhibición de la proliferación de células B periféricas humanas normales estimuladas por células T Jurkat; inhibición de la proliferación de células B periféricas humanas normales estimuladas por células que expresan CD40L o CD40 soluble; e inhibición de la proliferación de células B malignas humanas como se hace notar a continuación.

35 Véanse también los ensayos descritos en Schultze et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8200-8204; Denton et al. (1998) *Pediatr. Transplant.* 2: 6-15; Evans et al. (2000) *J. Immunol.* 164: 688-697; Noelle (1998) *Agents Actions Suppl.* 49: 17-22; Lederman et al. (1996) *Curr. Opin. Hematol.* 3: 77-86; Coligan et al. (1991) *Current Protocols in Immunology* 13: 12; Kwekkeboom et al. (1993) *Immunology* 79: 439-444; y las patentes estadounidenses n<sup>os</sup> 5.674.492 y 5.847.082.

40 Un ensayo representativo para detectar anticuerpos antagonistas anti CD40 específicos para los epítomos del antígeno CD40 identificados en el presente documento es un "ensayo de unión competitiva". Los ensayos de unión competitiva son ensayos serológicos en los que lo desconocido se detecta y cuantifica por su capacidad para inhibir la unión de un ligando conocido marcado a su anticuerpo específico. Esto también se conoce como un ensayo de inhibición competitiva. En un ensayo de unión competitiva representativo, se precipita el polipéptido CD40 marcado por medio de anticuerpos candidato en una muestra; por ejemplo, en combinación con anticuerpos monoclonales suscitados contra uno o más epítomos de los anticuerpos monoclonales dados a conocer en el presente documento. Los anticuerpos anti CD40 que reaccionan específicamente con un epítomo de interés pueden identificarse seleccionando una serie de anticuerpos preparados contra una proteína CD40 o un fragmento de la proteína que comprende el epítomo particular de la proteína CD40 de interés. Por ejemplo, para el CD40 humano, los epítomos de

interés incluyen epítomos que comprenden residuos lineales o no lineales de aminoácidos de la isoforma corta del CD40 humano (véase el n° de acceso de GenBank N° NP\_690593) presentada en la Figura 5B (SEC ID N° 10), codificada por la secuencia presentada en la Figura 5A (SEC ID N° 9; véase también el n° de acceso de GenBank NM\_152854), o de la isoforma larga del CD40 humano (véanse los n°s de acceso de GenBank CAA43045 y NP\_001241) presentada en la Figura 5D (SEC ID N° 12), codificada por la secuencia presentada en la Figura 5C (SEC ID N° 11; véanse los n°s de acceso de GenBank N X60592 y NM\_001250). Como alternativa, podrían usarse ensayos de unión competitiva con anticuerpos antagonistas anti CD40 adecuados identificados anteriormente para seleccionar los anticuerpos monoclonales comparables a los anticuerpos identificados anteriormente.

Un anticuerpo anti CD20 producido por cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, o cualquier otro procedimiento no dado a conocer en el presente documento, será útil según la presente revelación si posee al menos una de las siguientes actividades biológicas: iniciación de la citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo contra una célula que expresa CD20; entrega de una citotoxina o un radionúclido a la célula que expresa CD20; inhibición de la secreción de inmunoglobulinas por las células B periféricas humanas normales estimuladas por células T; inhibición de la proliferación de células B periféricas humanas normales estimuladas por células T Jurkat; inhibición de la proliferación de células B periféricas humanas normales estimuladas por células que expresan CD40L o CD40 soluble; e inhibición de la proliferación de células B malignas humanas como se hace notar a continuación. Los ensayos para detectar estas actividades son bien conocidos en la técnica, incluyendo los dados a conocer en la patente estadounidense n° 5.736.137.

Cualquiera de los anticuerpos antagonistas anti CD40 (o de sus fragmentos de unión al antígeno) o de los anticuerpos anti CD20 (o de sus fragmentos de unión al antígeno) descritos previamente puede conjugarse antes de su uso en los procedimientos dados a conocer en el presente documento. Los procedimientos para producir anticuerpos conjugados son conocidos en la técnica. Por consiguiente, el anticuerpo anti CD40 o el anticuerpo anti CD20 pueden marcarse usando una marcación indirecta o un enfoque de marcación indirecta. Por "marcación indirecta" o "enfoque de marcación indirecta" se entiende que un agente quelante se une covalentemente a un anticuerpo y se inserta al menos un radionúclido en el agente quelante. Véanse, por ejemplo, los agentes quelantes y radionúclidos descritos en Srivagtava y Mease (1991) Nucl. Med. Bio. 18: 589-603.

Marcadores adecuados incluyen fluoróforos, cromóforos, átomos radiactivos (especialmente  $^{32}\text{P}$  y  $^{125}\text{I}$ ), reactivos densos en electrones, enzimas y ligandos que tienen parejas de unión específicas. Las enzimas se detectan normalmente por su actividad. Por ejemplo, la peroxidasa del rábano picante se detecta usualmente mediante su capacidad para convertir 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) en un pigmento azul, cuantificable con un espectrofotómetro. "Pareja de unión específica" se refiere a una proteína capaz de unirse a una molécula de ligando con alta especificidad, como, por ejemplo, en el caso de un antígeno y un anticuerpo monoclonal específico para el mismo. Otras parejas de unión específica incluyen biotina y avidina o estreptavidina, IgG y proteína A, y las numerosas parejas de receptor-ligando conocidas en la técnica. Debiera entenderse que la descripción anterior no pretende categorizar los diversos marcadores en clases diferenciadas, ya que el mismo marcador puede servir en varios modos diferentes. Por ejemplo, el  $^{125}\text{I}$  puede servir como un marcador radioactivo o como un reactivo denso en electrones. HRP puede servir como enzima o como antígeno para un mAb. Además, pueden combinarse diversos marcadores para lograr el efecto deseado. Por ejemplo, los mAb y la avidina también requieren marcadores en la puesta en práctica de esta invención: así, puede marcarse un mAb con biotina, y detectarse su presencia con avidina marcada con  $^{125}\text{I}$ , o con un mAb antibiotina marcado con HRP. Otras permutaciones y posibilidades serán inmediatamente evidentes para las personas con un dominio normal de la técnica, y se consideran como equivalentes a lo descrito en la revelación.

De forma alternativa, el anticuerpo anti CD40 o el anticuerpo anti CD20 pueden ser marcados usando "marcación directa" o un "enfoque de marcación directa", en el que un radionúclido se fija covalentemente a un anticuerpo (normalmente a través de un residuo de aminoácido). Los radionúclidos de preferencia se proporcionan en Srivagtava y Mease (1991), *supra*. El enfoque de marcación indirecta es particularmente preferente. Véanse también, por ejemplo, los documentos de Publicación Internacional n°s WO 00/52031 y WO 00/52473, en los que se usa un conector para fijar el marcador radiactivo a los anticuerpos; y las formas marcadas de anticuerpos descritas en la patente estadounidense n° 6.015.542.

Además, un anticuerpo (o un fragmento del mismo) puede conjugarse a un resto terapéutico como una citotoxina, un agente terapéutico, un ion metálico radiactivo o un radioisótopo. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células. Algunos ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y sus análogos u homólogos. Los agentes terapéuticos incluyen, sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, fludarabina, 2-clorodeoxiadenosina, metotrexato, 6-mercaptapurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbacina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP, cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomomicina

(anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina) Los radioisótopos incluyen, sin limitación, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, Bi-213, Pd-109, Tc-99, In-111 y similares. Los conjugados de la revelación pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada; no debe interpretarse que el resto del fármaco esté limitado a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto del fármaco puede ser una proteína o un polipéptido que tenga una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina de difteria; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, el interferón alfa, el interferón beta, el factor de crecimiento de los nervios, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, el activador tisular del plasminógeno, o los modificadores de respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulador de colonias de macrófagos granulocitos ("GM-CSF"), factor estimulador de colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

Son bien conocidas las técnicas para conjugar tales restos terapéuticos a anticuerpos. Véanse, por ejemplo, Amon et al. (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, ed. Reisfeld et al. (Alan R. Liss, Inc.), páginas 243-256; ed. Hellstrom et al. (1987) "Antibodies for Drug Delivery," en *Controlled Drug Delivery*, ed. Robinson et al. (2ª ed; Marcel Dekker, Inc.), páginas 623-653; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, ed. Pinchera et al. páginas 475-506 (Editrice Kurtis, Milán, Italia, 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, ed. Baldwin et al. (Academic Press, Nueva York, 1985), páginas 303-316; y Thorpe et al. (1982) *Immunol. Rev.* 62: 119-158.

De forma alternativa, un anticuerpo puede conjugarse a un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpos como se describe en la patente estadounidense nº 4.676.980. Además, pueden usarse conectores entre los marcadores y los anticuerpos de la revelación (véase la patente estadounidense nº 4.831.175). Los anticuerpos o sus fragmentos de unión al antígeno pueden marcarse directamente con yodo, indio, itrio radiactivos o con otras partículas radiactivas conocidas en la técnica (patente estadounidense nº 5.595.721). El tratamiento puede consistir en una combinación de tratamiento con anticuerpos conjugados y no conjugados administrados de forma simultánea o secuencial, en cualquier orden, el mismo día o en días diferentes (documentos WO 00/52031 y WO 00/52473). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti CD20 está conjugado con el anticuerpo anti CD40. En otras realizaciones adicionales, un único anticuerpo comprende una especificidad dual tanto hacia CD20 como hacia CD40. Tales anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense nº 5.959.084.

#### **Variantes de anticuerpos antagonistas anti CD40 y anticuerpos anti CD20**

En los procedimientos dados a conocer en el presente documento pueden usarse variantes de los anticuerpos anti CD40 antagonistas o de anticuerpos anti CD20 biológicamente activas adecuadas. Tales variantes retendrán las propiedades de unión deseadas del anticuerpo padre, es decir, del anticuerpo antagonista anti CD40 original o del anticuerpo anti CD20 original. Por lo general, en la técnica están disponibles procedimientos para producir variantes de anticuerpos.

Por ejemplo, pueden prepararse variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo anti CD20, por ejemplo el IDEC-C2B8 descrito en el presente documento, o de un anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 o CHIR-12.12 descritos en el presente documento, por medio de mutaciones en la secuencia de ADN clonada que codifica el anticuerpo de interés. Los procedimientos para mutagénesis y alteraciones de secuencias de nucleótidos son bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Walker y Gastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, Nueva York); Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488-492; Kunkel et al. (1987) *Methods Enzymol.* 154: 367-382; Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, Nueva York); patente estadounidense nº 4.873.192 y las referencias citadas en la misma. En el modelo de Dayhoff et al. (1978) en *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.) puede encontrarse orientación para sustituciones adecuadas de aminoácidos que no afectan la actividad biológica del polipéptido de interés. Pueden ser preferentes las sustituciones conservadoras, tales como los intercambios de un aminoácido con otro que tiene propiedades similares. Ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen, sin limitación, Gly↔Ala, Val↔Ile↔Leu, Asp↔Glu, Lys↔Arg, Asn↔Gln, y Phe↔Trp↔Tyr.

En la construcción de variantes polipeptídicas de interés del anticuerpo anti CD20 o del anticuerpo antagonista anti CD40, las modificaciones se realizan de manera tal que las variantes sigan teniendo la actividad deseada, es decir, afinidad de unión similar, y sean capaces de unirse específicamente a un antígeno CD20 o CD40 humano expresado en la superficie de una célula humana, respectivamente, y estén libres de actividad agonista significativa pero que exhiban actividad antagonista cuando se unen a un antígeno CD40 en una célula humana que expresa CD40. Obviamente, cualquier mutación realizada en el ADN que codifica la variante polipeptídica no debe colocar a la secuencia fuera del marco de lectura y, preferentemente, no creará regiones complementarias que pudieran producir una estructura de ARNm secundaria. Véase la Publicación de Solicitud de Patente nº 75.444.

Además, la región constante de un anticuerpo antagonista anti CD40 puede mutarse para alterar la función efectora en una serie de formas. Por ejemplo, véanse la patente estadounidense nº 6.737.056B1 y la Publicación de Solicitud de Patente nº 2004/0132101A1, que dan a conocer mutaciones de Fc que optimizan la unión del anticuerpo a los receptores de Fc.

- 5 Preferentemente, las variantes de un anticuerpo anti CD20 o de un anticuerpo antagonista anti CD40 de referencia tienen secuencias de aminoácidos que tienen al menos un 70 % o un 75 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos un 80 % u 85 % de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % o 95 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos para el anticuerpo anti CD20 de referencia, por ejemplo el IDEC-C2B8, tal como se describe en el presente documento, o a la molécula del anticuerpo antagonista anti CD40 de referencia, por ejemplo los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 o CHIR-12.12 descritos en el presente documento, o con respecto a una porción más corta de la molécula de anticuerpo de referencia. Más preferentemente, las moléculas comparten al menos un 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia. Para los fines de la presente revelación, el porcentaje de identidad de secuencia se determina usando el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda de huecos afines con parámetros de penalización de hueco abierto de 12 y penalización de extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se enseña en Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489. Una variante puede, por ejemplo, diferir del anticuerpo antagonista anti CD40 de referencia en solo 1 a 15 residuos de aminoácidos, solo en 1 a 10 residuos de aminoácidos, tal como 6-10, solo en 5, solo en 4, 3, 2, o incluso en 1 residuo de aminoácido.
- 20 Con respecto a la alineación óptima de dos secuencias de aminoácidos, el segmento contiguo de la secuencia de aminoácidos variante puede tener residuos de aminoácidos adicionales o residuos de aminoácidos delecionados con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia. El segmento contiguo usado para la comparación con la secuencia de aminoácidos de referencia incluirá al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos y puede tener 30, 40, 50 o más residuos de aminoácidos. Pueden hacerse correcciones para identidad de secuencia asociadas con huecos o sustituciones conservadoras de residuos (véase el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman).

- La estructura química exacta de un polipéptido capaz de unirse específicamente a CD40 y que retiene la actividad antagonista, en particular cuando se une al antígeno CD20, particularmente cuando se une al antígeno en células B malignas, depende de una serie de factores. Como en la molécula están presentes grupos amino y carboxilo ionizables, puede obtenerse un polipéptido particular como una sal ácida o básica, o en forma neutra. Todas las preparaciones que retienen su actividad biológica cuando se colocan en condiciones ambientales adecuadas están incluidas en la definición de anticuerpos antagonistas anti CD40 o anticuerpos anti CD20 tal como se usan en el presente documento. Además, puede aumentarse la secuencia de aminoácidos principal del polipéptido por derivatización con restos de azúcar (glicosilación) o por medio de otras moléculas complementarias tales como lípidos, fosfato, grupos acetilo y similares. También puede aumentarse por conjugación con sacáridos. Ciertos aspectos de tal aumento se realizan a través de sistemas de procesamiento postraduccionales del anfitrión productor; otras de tales modificaciones pueden introducirse *in vitro*. En cualquier caso, tales modificaciones están incluidas en la definición de un anticuerpo anti CD40 o de un anticuerpo anti CD20 usada en el presente documento siempre que no se destruyan las propiedades del anticuerpo anti CD40 (incluyendo la actividad antagonista) o del anticuerpo anti CD20. Se espera que tales modificaciones puedan afectar cuantitativamente o cualitativamente la actividad, ya sea aumentando o disminuyendo la actividad del polipéptido, en los diversos ensayos. Además, pueden modificarse residuos de aminoácidos individuales en la cadena por oxidación, reducción u otra derivatización, y el polipéptido puede escindirse para obtener fragmentos que retengan la actividad. Tales alteraciones que no destruyen la actividad deseable del anticuerpo no modificado no quitan la secuencia del polipéptido de la definición de anticuerpos anti CD40 y anti CD20 de interés según se usa en el presente documento.

- La técnica proporciona orientación sustancial con respecto a la preparación y al uso de las variantes de polipéptidos. En la preparación de las variantes de anticuerpos, un experto en la técnica puede determinar fácilmente qué modificaciones a la secuencia de nucleótidos o aminoácidos de la proteína nativa darán como resultado una variante que sea adecuada para su uso como un componente terapéuticamente activo de una composición farmacéutica usada en los procedimientos descritos en el presente documento.

### **Formulaciones farmacéuticas y modos de administración**

- La combinación del anticuerpo anti CD20 (o del fragmento del mismo de enlace al antígeno) y del anticuerpo antagonista anti CD40 (o del fragmento del mismo de enlace al antígeno) se administra en una concentración que es terapéuticamente eficaz para prevenir o tratar un cáncer caracterizado por un crecimiento de células B neoplásicas, particularmente cánceres que comprende células B neoplásicas que expresan antígenos tanto CD40 como CD20. Para lograr este objetivo, los anticuerpos pueden formularse usando una diversidad de excipientes aceptables conocidos en la técnica. Normalmente, los anticuerpos se administran por medio de inyección, ya sea por vía intravenosa, intraperitoneal o por vía subcutánea. Los procedimientos para llevar a cabo esta administración son conocidos por las personas con un dominio normal de la técnica. También es posible obtener composiciones que

pueden administrarse por vía tópica o por vía oral, o que pueden ser capaces de transmitirse a través de membranas mucosas.

La administración intravenosa se realiza preferentemente por medio de infusión durante un periodo de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10 horas, más preferentemente durante aproximadamente 1 hasta aproximadamente 8 horas, más preferentemente aún durante aproximadamente 2 hasta aproximadamente 7 horas, todavía más preferentemente durante aproximadamente 4 hasta aproximadamente 6 horas, dependiendo del anticuerpo que se administra. La infusión inicial con la composición farmacéutica puede administrarse durante un periodo de aproximadamente 4 hasta aproximadamente 6 horas con infusiones posteriores administradas de manera más rápida. Las infusiones posteriores pueden administrarse durante un periodo de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 6 horas, incluyendo, por ejemplo, aproximadamente 1 hasta aproximadamente 4 horas, aproximadamente 1 hasta aproximadamente 3 horas, o aproximadamente 1 hasta aproximadamente 2 horas.

Una composición farmacéutica de la revelación está formulada para que sea compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de posibles vías de administración incluyen la administración parenteral (por ejemplo, intravenosa (IV), intramuscular (IM), intradérmica, subcutánea (SC), o la infusión), oral y pulmonar (por ejemplo, inhalación), nasal, transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Las disoluciones o suspensiones usadas para aplicaciones parenterales, intradérmicas o subcutáneas pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril, tal como agua para inyección, disolución salina, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para ajustar la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples fabricados de vidrio o de plástico.

Los anticuerpos se proporcionan normalmente por medio de técnicas convencionales en un tampón farmacéuticamente aceptable, por ejemplo disolución salina estéril, agua tamponada estéril, propilenglicol, combinaciones de los anteriores, etc. El anticuerpo antagonista anti CD40 (o el fragmento del mismo de unión al antígeno) y el anticuerpo anti CD20 (o el fragmento del mismo de unión al antígeno) pueden ser formulados en composiciones farmacéuticas separadas, o pueden ser formulados dentro de una única composición farmacéutica para su administración simultánea. En Remington's Pharmaceutical Sciences (18ª ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pensilvania, 1990) se describen procedimientos para preparar agentes que pueden administrarse por vía parenteral. Véase también, por ejemplo, el documento WO 98/56418, que describe formulaciones farmacéuticas de anticuerpos estabilizadas adecuadas para usar en los procedimientos descritos en el presente documento.

Una persona con un dominio normal de la técnica puede determinar fácilmente sin experimentación indebida la cantidad de una combinación de al menos un anticuerpo antagonista anti CD40 o un fragmento del mismo de unión al antígeno y al menos un anticuerpo anti CD20 o un fragmento del mismo de unión al antígeno que ha de administrarse. Los factores que influyen en el modo de administración y la respectiva cantidad de la combinación de los anticuerpos dados a conocer en el presente documento incluyen, sin limitación, la gravedad de la enfermedad, la historia de la enfermedad, y la edad, altura, peso, salud y condición física del individuo que se somete a la terapia. De manera similar, la cantidad de la combinación de anticuerpos dados a conocer en el presente documento que ha de ser administrada dependerá del modo de administración y de si el sujeto se someterá a una monodosis o a dosis múltiples de estos agentes antitumorales. Por lo general, al aumentar el peso del sujeto sometido a la terapia, resulta preferentemente una dosis más alta de la combinación de anticuerpos dada a conocer en el presente documento. La dosis, ya sea del anticuerpo anti CD20 (o del fragmento del mismo de unión al antígeno) o del anticuerpo antagonista anti CD40 (o del fragmento del mismo de unión al antígeno) que ha de administrarse está en el intervalo desde aproximadamente 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg, preferentemente en el intervalo de 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 40 mg/kg. Así, por ejemplo, la dosis de un anticuerpo cualquiera de la combinación puede ser de 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg o 50 mg/kg.

En otra realización de la divulgación, la revelación comprende la administración de dosis múltiples de anticuerpo anti CD20 (o un fragmento del mismo de enlace con el antígeno) en combinación con dosis múltiples de anticuerpo antagonista anti CD40 (o un fragmento del mismo de enlace con el antígeno). El procedimiento puede comprender la administración de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o más dosis terapéuticamente eficaces de una composición farmacéutica que comprende ya sea un anticuerpo anti CD20 (o un fragmento del mismo de enlace con el antígeno) o un anticuerpo antagonista anti CD40 (o un fragmento del mismo de enlace con el antígeno), o ambos. La frecuencia y la duración de la administración de las dosis múltiples de las composiciones farmacéuticas pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica sin experimentación indebida. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de anticuerpos puede incluir un tratamiento único o, preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferente, se trata al sujeto con la combinación de un anticuerpo anti CD20 (o un fragmento del mismo de enlace con el antígeno) y un anticuerpo antagonista anti CD40 (o un fragmento del mismo de enlace con el antígeno) en la que ambos son administrados



5 con una dosis en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 y 20 mg/kg de peso corporal, una vez por semana durante aproximadamente entre 1 y 10 semanas, preferentemente aproximadamente entre 2 y 8 semanas, más preferentemente aproximadamente entre 3 y 7 semanas, y aún más preferentemente durante aproximadamente 4, 5, o 6 semanas. El tratamiento puede llevarse a cabo anualmente para prevenir la recaída o tras la indicación de la recaída.

También se entenderá que la dosis eficaz de los anticuerpos o de sus fragmentos de unión al antígeno usada para el tratamiento puede aumentar o disminuir en el transcurso de un tratamiento particular. Los cambios en la dosis pueden ser consecuencia y pueden resultar evidentes a partir de los resultados de los ensayos de diagnóstico como se describe en el presente documento. Así, en una forma de realización, el régimen de dosificación incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD20 (o del fragmento del mismo de enlace con el antígeno) en combinación con una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo antagonista anti CD40 (o del fragmento del mismo de enlace con el antígeno) en la que la combinación es administrada los días 1, 8, 15 y 22 de un periodo de tratamiento. En otra forma de realización, el régimen de dosificación incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD20 (o del fragmento del mismo de enlace con el antígeno) en combinación con una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo antagonista anti CD40 (o del fragmento del mismo de enlace con el antígeno) en la que la combinación es administrada los días 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 de una semana en un periodo de tratamiento. Otras realizaciones adicionales incluyen un régimen de dosificación en el que se administra una dosis terapéuticamente eficaz de anticuerpo anti CD20 (o de un fragmento del mismo de unión al antígeno) en combinación con una dosis terapéuticamente eficaz de anticuerpo antagonista anti CD40 (o de un fragmento del mismo de unión al antígeno) en el que la combinación se administra en los días 1, 3, 5 y 7 de una semana en un periodo de tratamiento; un régimen de dosificación incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD20 (o de un fragmento del mismo de unión al antígeno) en combinación con una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo antagonista anti CD40 (o de un fragmento del mismo de unión al antígeno) en el que la combinación se administra en los días 1 y 3 de una semana en un periodo de tratamiento; y un régimen de dosificación preferente que incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD20 (o de un fragmento del mismo de unión al antígeno) en combinación con una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo antagonista anti CD40 (o de un fragmento del mismo de unión al antígeno) en el que la combinación se administra en el día 1 de cualquier semana dada en un periodo de tratamiento. El periodo de tratamiento puede comprender 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, un mes, 3 meses, 6 meses o un año. Los periodos de tratamiento pueden ser consecutivos o pueden estar separados uno de otro por un día, una semana, 2 semanas, un mes, 3 meses, 6 meses o un año. El tratamiento usando una combinación del anticuerpo antagonista anti CD40 (o del fragmento del mismo de unión al antígeno) y del anticuerpo anti CD20 (o un fragmento del mismo de unión al antígeno) puede comprender la administración de uno o ambos anticuerpos simultáneamente o de forma concurrente, siempre que el tratamiento incluya la combinación del anticuerpo anti CD20 (o del fragmento del mismo de unión al antígeno) y del anticuerpo antagonista anti CD40 (o del fragmento del mismo de unión al antígeno) en algún punto durante el tratamiento. El efecto de la terapia de combinación también puede ser optimizado variando el momento de la administración, ya sea del tratamiento anticuerpo anti CD20 y/o del anticuerpo antagonista anti CD40. El tratamiento con un anticuerpo anti CD20 o un fragmento del mismo de unión al antígeno en combinación con un anticuerpo antagonista anti CD40 o un fragmento del mismo de unión al antígeno puede ser simultánea (concurrente), consecutiva (secuencial) o una combinación de las mismas. Por lo tanto, un sujeto sometido a terapia con combinación de anticuerpos puede recibir tanto el anticuerpo anti CD20 (o el fragmento del mismo de unión al antígeno) como el antagonista anti CD40 (o el fragmento del mismo de unión al antígeno) a la vez (es decir, simultáneamente) o en momentos distintos (es decir, secuencialmente, en cualquier orden, en el mismo día o en días diferentes). Así, en algunas realizaciones, el anticuerpo anti CD20, por ejemplo el Rituxan® (o un fragmento del mismo de unión al antígeno) es administrado simultáneamente con el anticuerpo antagonista anti CD40, como el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o el CHIR-5.9 (o un fragmento del mismo de unión al antígeno). En otras realizaciones, se administra primero el anticuerpo anti CD20, como el Rituxan® (o un fragmento del mismo de unión al antígeno) y luego se administra el anticuerpo antagonista anti CD40, como el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o el CHIR-5.9 (o un fragmento del mismo de unión al antígeno). En otras realizaciones adicionales, se administra primera el anticuerpo antagonista anti CD40, como el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o el CHIR-5.9 (o un fragmento del mismo de unión al antígeno) y después se administra el anticuerpo anti CD20, como el Rituxan® (o un fragmento del mismo de unión al antígeno). En algunas realizaciones, la combinación de anticuerpos anti CD20 y anticuerpos antagonistas anti CD40, como el Rituxan® y los anticuerpos monoclonales CHIR-12.12 o CHIR-5.9, se da de forma concurrente para una dosis, pero otras dosis incluyen una administración secuencial, en cualquier orden, en el mismo día o en días distintos. Cuando se administran simultáneamente el anticuerpo anti CD20, como el Rituxan®, and el anticuerpo antagonista anti CD40, como el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o el CHIR-5.9, pueden administrarse como composiciones farmacéuticas separadas, comprendiendo cada una de ellas ya sea el anticuerpo anti CD20 (o el fragmento del mismo de unión al antígeno) o el anticuerpo antagonista anti CD40 (o el fragmento del mismo de unión al antígeno), o pueden administrarse como una única composición farmacéutica que comprende ambos agentes anticancerosos.

En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo antagonista anti CD40 o de un fragmento del mismo de unión al antígeno varía desde aproximadamente 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg, desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 40 mg/kg, desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta

aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 0,5 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 25 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg, desde aproximadamente 5 mg/kg hasta aproximadamente 15 mg/kg, o desde aproximadamente 7 mg/kg hasta aproximadamente 12 mg/kg. Así, por ejemplo, la dosis de cualquier anticuerpo antagonista anti CD40 de un fragmento del mismo de unión al antígeno, por ejemplo el anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR-12.12 o CHIR-5.9 o un fragmento del mismo de unión al antígeno, puede ser de 0,003 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg u otra dosis semejante que esté dentro el intervalo desde aproximadamente 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg. La misma dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antagonista anti CD40 o de un fragmento del mismo de unión al antígeno puede administrarse a lo largo de cada semana de dosificación del anticuerpo. Como alternativa, pueden usarse diferentes dosis terapéuticamente eficaces de un anticuerpo antagonista anti CD40 o de un fragmento del mismo de unión al antígeno durante el transcurso de un periodo de tratamiento.

En otras realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz inicial de un anticuerpo anti CD40 antagonista o del fragmento del mismo de unión al antígeno según se define en otra parte en el presente documento puede estar en el intervalo de dosificación inferior (es decir, desde aproximadamente 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg) con dosis subsiguientes dentro del intervalo de dosificación superior (es decir, desde aproximadamente 20 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg).

En realizaciones alternativas, la dosis terapéuticamente eficaz inicial de un anticuerpo antagonista anti CD40 o de un fragmento del mismo de unión al antígeno según se define en otra parte en el presente documento puede estar en el intervalo de dosificación superior (es decir, desde aproximadamente 20 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg) con dosis subsiguientes dentro del intervalo de dosificación inferior (es decir, desde 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg). Así, en una realización, la dosis terapéuticamente eficaz inicial del anticuerpo antagonista anti CD40 o de un fragmento del mismo de unión al antígeno es de aproximadamente 20 mg/kg hasta aproximadamente 35 mg/kg, incluyendo aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg y aproximadamente 35 mg/kg, y las posteriores dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo antagonista anti CD40 o del fragmento del mismo de unión al antígeno son de aproximadamente 5 mg/kg hasta aproximadamente 15 mg/kg, incluyendo aproximadamente 5 mg/kg, 8 mg/kg, 10 mg/kg, 12 mg/kg y aproximadamente 15 mg/kg.

En algunas realizaciones de la revelación, la terapia con anticuerpo antagonista anti CD40 se inicia administrando una "dosis de carga" del anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno al sujeto que necesita terapia con anticuerpos antagonistas anti CD40. Por "dosis de carga" se entiende una dosis inicial del anticuerpo antagonista anti CD40 o del fragmento del mismo de unión al antígeno que se administra al sujeto, en la que la dosis del anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno administrado está dentro del intervalo de dosificación superior (es decir, desde aproximadamente 20 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg). La "dosis de carga" puede administrarse como una única administración, por ejemplo, una infusión única en la que el anticuerpo o el fragmento del mismo de unión al antígeno se administra por vía IV, o como administraciones múltiples, por ejemplo, infusiones múltiples en las que el anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno se administran por vía IV, siempre que la "dosis de carga" completa se administre en un periodo de aproximadamente 24 horas. Tras la administración de la "dosis de carga", se administran a continuación al sujeto una o más dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo antagonista anti CD40 o del fragmento del mismo de unión al antígeno. Pueden administrarse dosis terapéuticamente eficaces posteriores, por ejemplo, según un programa de dosificación semanal, o una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, o una vez cada cuatro semanas. En tales formas de realización, las dosis terapéuticamente eficaces posteriores generalmente están en el intervalo de dosificación inferior (es decir, desde 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg).

De forma alternativa, en algunas formas de realización, tras la "dosis de carga", las posteriores dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo antagonista anti CD40 o de su fragmento de unión al antígeno se administran según un "programa de mantenimiento", en el que la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno se administra una vez al mes, una vez cada 6 semanas, una vez cada dos meses, una vez cada 10 semanas, una vez cada tres meses, una vez cada 14 semanas, una vez cada cuatro meses, una vez cada 18 semanas, una vez cada cinco meses, una vez cada 22 semanas, una vez cada seis meses, una vez cada 7 meses, una vez cada 8 meses, una vez cada 9 meses, una vez cada 10 meses, una vez cada 11 meses o una vez cada 12 meses. En tales formas de realización, la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo antagonista anti CD40 o su fragmento de unión al antígeno está en el intervalo de dosificación inferior (es decir, desde 0,003 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg), en particular cuando las dosis posteriores se administran en intervalos más frecuentes, por ejemplo, una vez cada dos semanas hasta una vez al mes, o dentro del intervalo de dosificación superior (es decir, desde aproximadamente 20 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg), en particular cuando las dosis posteriores se administran en intervalos menos frecuentes, por ejemplo cuando las dosis posteriores se administran separadas por aproximadamente un mes hasta aproximadamente 12 meses.

Las composiciones farmacéuticas útiles en los procedimientos dados a conocer en el presente documento pueden comprender variantes biológicamente activas ya sea de los anticuerpos anti CD20 (o de fragmentos de los mismos de unión al antígeno) o de los anticuerpos antagonistas anti CD40 (o de fragmentos de los mismos de unión al antígeno), o de ambos. Tales variantes deben retener la actividad biológica deseada del polipéptido nativo, de tal forma que la composición farmacéutica que comprende el polipéptido variante tenga el mismo efecto terapéutico que la composición farmacéutica que comprende el polipéptido nativo cuando se administra a un sujeto. Es decir, el anticuerpo variante servirá de componente terapéuticamente activo en la composición farmacéutica de manera similar a la observada para el anticuerpo antagonista nativo, por ejemplo los anticuerpos monoclonales CHIR-5.9 o CHIR-12.12, tal como están expresados por la línea celular de hibridoma 5.9 o 12.12, e IDEC-C2B8, respectivamente. En la técnica están disponibles procedimientos para determinar si un anticuerpo variante retiene la actividad biológica deseada, y sirve por consiguiente como un componente terapéuticamente activo en la composición farmacéutica. La actividad biológica de las variantes del anticuerpo puede medirse usando ensayos específicamente diseñados para medir la actividad del anticuerpo antagonista nativo, incluidos los ensayos descritos en el presente documento.

Cualquier composición farmacéutica que comprenda un anticuerpo anti CD20 que tenga las propiedades de unión descritas en el presente documento o un anticuerpo antagonista anti CD40 que tenga las propiedades de unión descritas en el presente documento como el componente terapéuticamente activo puede usarse en los procedimientos dados a conocer en el presente documento. Por consiguiente, las composiciones líquidas, liofilizadas o secadas por pulverización que comprenden uno o más de los anticuerpos útiles en la puesta en práctica de la revelación pueden prepararse como una disolución o suspensión acuosa o no acuosa para la posterior administración a un sujeto de acuerdo con los procedimientos dados a conocer en el presente documento. Cada una de estas composiciones comprenderá al menos uno de los anticuerpos anti CD20 (o un fragmento del mismo de unión al antígeno) o anticuerpos antagonistas anti CD40 (o un fragmento del mismo de unión al antígeno) como un componente terapéuticamente o profilácticamente activo. Por "componente terapéuticamente o profilácticamente activo" se entiende que el anticuerpo o el fragmento del mismo de unión al antígeno está específicamente incorporado en la composición para provocar una respuesta terapéutica o profiláctica con respecto al tratamiento, la prevención o el diagnóstico de una enfermedad o afección en un sujeto cuando se administra la composición farmacéutica a ese sujeto. Preferentemente la composición farmacéutica comprende agentes estabilizantes, agentes de carga adecuados, o ambos, para minimizar los problemas asociados con la pérdida de estabilidad y actividad biológica de las proteínas durante la preparación y el almacenamiento.

Pueden añadirse compuestos de formulación a las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos útiles en la puesta en práctica de la revelación. Estos compuestos de formulación pueden incluir, sin limitación, aceites, polímeros, vitaminas, hidratos de carbono, aminoácidos, sales, tampones, albúmina, tensioactivos o agentes de carga. Los hidratos de carbono preferentemente incluyen azúcares o alcoholes de azúcar tales como mono-, di- o polisacáridos, o glucanos solubles en agua. Los sacáridos o glucanos pueden incluir fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, sacarosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina  $\alpha$  y  $\beta$ , almidón soluble, hidroxietil almidón y carboximetilcelulosa, o sus mezclas. Se define "alcohol de azúcar" como un hidrocarburo  $C_4$  a  $C_8$  que tiene un grupo hidroxilo e incluye galactitol, inositol, manitol, xilitol, sorbitol, glicerol y arabitól. Estos azúcares o alcoholes de azúcar pueden usarse de manera individual o en combinación. La concentración del azúcar o del alcohol de azúcar está entre el 1,0 % y el 7 % p/v., más preferentemente entre el 2,0 % y el 6,0 % p/v. Los aminoácidos, preferentemente, incluyen formas levóginas (L) de carnitina, arginina, y betaína; sin embargo, pueden añadirse otros aminoácidos. Preferentemente los polímeros incluyen polivinilpirrolidona (PVP) con un peso molecular promedio entre 2.000 y 3.000, o polietilenglicol (PEG) con un peso molecular promedio entre 3.000 y 5.000. Los tensioactivos que pueden añadirse a la formulación se muestran en los documentos EP n<sup>os</sup> 270.799 y 268.110.

Además, los anticuerpos pueden modificarse químicamente por conjugación covalente a un polímero para, por ejemplo, aumentar su vida media de circulación. Preferentemente, los polímeros y los procedimientos para ligarlos a péptidos se muestran en las patentes estadounidenses n<sup>os</sup> 4.766.106, 4.179.337, 4.495.285 y 4.609.546. Los polímeros, preferentemente, son polioles polioxietilados y polietilenglicol (PEG). El PEG es soluble en agua a temperatura ambiente y tiene la fórmula general:  $R(O-CH_2-CH_2)_n-O-R$ , pudiendo R ser hidrógeno, o un grupo protector tal como un grupo alquilo o alcohol. Preferentemente, el grupo protector tiene entre 1 y 8 carbonos; más preferentemente es metilo. El símbolo n es un número entero positivo, preferentemente entre 1 y 1.000, más preferentemente entre 2 y 500. El PEG tiene, preferentemente, un peso molecular promedio entre 1.000 y 40.000, más preferentemente entre 2.000 y 20.000, más preferentemente aún entre 3.000 y 12.000. Preferentemente, el PEG tiene al menos un grupo hidroxilo, más preferentemente es un grupo hidroxilo terminal. Este es el grupo hidroxilo que se activa preferentemente para reaccionar con un grupo amino libre en el inhibidor. Sin embargo, se entenderá que el tipo y la cantidad de los grupos reactivos pueden variarse para obtener un PEG/anticuerpo de la presente revelación conjugado de manera covalente.

Los polioles polioxietilados solubles en agua también son útiles en la presente invención. Estos incluyen sorbitol polioxietilado, glucosa polioxietilada, glicerol polioxietilado (POG), y otros. Resulta preferente el POG. Una razón es porque la estructura central glicerol del glicerol polioxietilado es la misma estructura central que se presenta en la naturaleza en, por ejemplo, animales y seres humanos en los mono-, di-, triglicéridos. Por consiguiente, esta ramificación no será considerada necesariamente como un agente extraño en el cuerpo. El POG tiene un peso

molecular, preferentemente, en el mismo intervalo que el PEG. La estructura para el POG se muestra en Knauf et al. (1988) J. Bio. Chem. 263:15064-15070, y puede encontrarse un análisis de conjugados POG/IL2 en la patente estadounidense nº 4.766.106.

5 Otro sistema de administración de fármacos para aumentar la semivida circulatoria es el liposoma. Los procedimientos para preparar los sistemas de administración de liposomas se analizan en Gabizon et al. (1982) Cancer Research 42:4734; Cafiso (1981) Biochem Biophys Acta 649:129; y Szoka (1980) Ann. Rev. Biophys. Eng. 9:467. En la técnica se conocen otros sistemas de administración de fármacos y están descritos, por ejemplo, en Poznansky et al. (1980) Drug Delivery Systems (R. L. Juliano, ed., Oxford, Nueva York) páginas 253-315; Poznansky (1984) Pharm Revs 36:277.

10 Los compuestos de formulación a incorporar en una composición farmacéutica deberían proporcionar estabilidad del anticuerpo antagonista anti CD40 o de su fragmento de unión al antígeno. Es decir, el anticuerpo antagonista anti CD40 o su fragmento de unión al antígeno deberá retener su estabilidad física y/o química y deberá tener la actividad biológica deseada, es decir, una o más de las actividades definidas anteriormente en el presente documento, incluidas, sin limitación, inhibición de la secreción de inmunoglobulinas por células B periféricas humanas normales estimuladas por células T; inhibición de la supervivencia y/o proliferación de las células B periféricas humanas normales estimuladas por células T Jurkat; inhibición de la supervivencia y/o proliferación de las células B periféricas humanas normales estimuladas por células que expresan CD40L o ligando de CD40 soluble (sCD40L); inhibición de señales intracelulares antiapoptóticas de "supervivencia" en cualquier célula estimulada por sCD40L o CD40L de fase sólida; inhibición de la transducción de señal de CD40 en cualquier célula tras la unión con sCD40L o CD40L de fase sólida; e inhibición de la proliferación de células B humanas malignas, como se señaló en otra parte en el presente documento.

Los procedimientos para controlar la estabilidad de las proteínas son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Jones (1993) Adv Drug Delivery Rev. 10:29-90; Lee, ed. (1991) Peptide and Protein Drug Delivery (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Nueva York); y los ensayos de estabilidad que se dan a conocer en el presente documento a continuación. En general, la estabilidad de las proteínas se mide a una temperatura elegida durante un periodo de tiempo especificado. En realizaciones preferentes, una formulación farmacéutica de anticuerpo estable proporciona estabilidad del anticuerpo antagonista anti CD40 o su fragmento de unión al antígeno cuando se almacena a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) durante al menos 1 mes, al menos 3 meses, o al menos 6 meses, y/o es estable aproximadamente a 2-8 °C durante al menos 6 meses, al menos 9 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses.

Una proteína tal como un anticuerpo, cuando se formula en una composición farmacéutica, se considera que mantiene su estabilidad física en un momento dado si no muestra signos visuales (es decir, decoloración o pérdida de transparencia) o signos que puedan medirse (por ejemplo, usando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) o dispersión de luz UV) de precipitación, agregación, y/o desnaturalización en esa composición farmacéutica. Con respecto a la estabilidad química, una proteína tal como un anticuerpo, cuando se formula en una composición farmacéutica, se considera que mantiene su estabilidad química en un momento dado si las medidas de estabilidad química son indicativas de que la proteína (es decir, el anticuerpo) retiene su actividad biológica de interés en esa composición farmacéutica. Los procedimientos para controlar los cambios en la estabilidad química son bien conocidos en la técnica e incluyen, sin limitación, procedimientos para detectar formas químicamente alteradas de la proteína, tales como los que resultan de cortes usando, por ejemplo, SDS-PAGE, SEC, y/o espectrometría de masas por tiempo de vuelo de desorción/ionización de láser asistida por matriz; y degradación asociada con cambios en la carga molecular (por ejemplo, asociada con desamidación), usando, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico. Véanse, por ejemplo, los procedimientos que se dan a conocer en el presente documento a continuación.

Se considera que un anticuerpo antagonista anti CD40 o su fragmento de unión al antígeno, cuando se formula en una composición farmacéutica, mantiene una actividad biológica deseada en un momento dado si la actividad biológica deseada en ese momento está aproximadamente dentro del 30 %, preferentemente aproximadamente dentro del 20 % de la actividad biológica deseada exhibida en el momento en que se preparó la composición farmacéutica según se determina en un ensayo adecuado para la actividad biológica deseada. Los ensayos para medir la actividad biológica deseada de los anticuerpos antagonistas anti CD40 dados a conocer en el presente documento, y sus fragmentos que se unen al antígeno, pueden llevarse a cabo como se describe en los Ejemplos en el presente documento. Véanse también los ensayos descritos en Schultze et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:8200-8204; Denton et al. (1998) Pediatr. Transplant. 2:6-15; Evans et al. (2000) J. Immunol. 164:688-697; Noelle (1998) Agents Actions Suppl. 49:17-22; Lederman et al. (1996) Curr. Opin. Hematol. 3:77-86; Coligan et al. (1991) Current Protocols in Immunology 13:12; Kwakkeboom et al. (1993) Immunology 79:439-444; y las patentes estadounidenses nºs 5.674.492 y 5.847.082.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo antagonista anti CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno se formula en una formulación farmacéutica líquida. El anticuerpo antagonista anti CD40 o su fragmento de unión al antígeno puede prepararse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluidos los procedimientos dados a conocer anteriormente en el presente documento. En una realización, el anticuerpo antagonista anti CD40, por ejemplo, el anticuerpo

monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno se produce de manera recombinante en una línea celular CHO.

Tras su preparación y purificación, el anticuerpo antagonista anti CD40 o su fragmento de unión al antígeno puede formularse como una formulación farmacéutica líquida de la manera expuesta en el presente documento. Cuando el anticuerpo antagonista anti CD40 o su fragmento de unión al antígeno deben almacenarse antes de su formulación, pueden congelarse, por ejemplo, a  $\leq -20$  °C, y, a continuación, descongelarse a temperatura ambiente para otra formulación. La formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo antagonista anti CD40 o de su fragmento de unión al antígeno. La cantidad de anticuerpo o de su fragmento de unión al antígeno presente en la formulación tiene en consideración la vía de administración y el volumen de dosis deseado.

De esta manera, la composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo antagonista anti CD40, por ejemplo, el anticuerpo CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 50,0 mg/ml, aproximadamente 0,5 mg/ml hasta aproximadamente 40,0 mg/ml, aproximadamente 1,0 mg/ml hasta aproximadamente 30,0 mg/ml, aproximadamente 5,0 mg/ml hasta aproximadamente 25,0 mg/ml, aproximadamente 5,0 mg/ml hasta aproximadamente 20,0 mg/ml, o aproximadamente 15,0 mg/ml hasta aproximadamente 25,0 mg/ml. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo antagonista anti CD40 o su fragmento de unión al antígeno en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 5,0 mg/ml, aproximadamente 5,0 mg/ml hasta aproximadamente 10,0 mg/ml, aproximadamente 10,0 mg/ml hasta aproximadamente 15,0 mg/ml, aproximadamente 15,0 mg/ml hasta aproximadamente 20,0 mg/ml, aproximadamente 20,0 mg/ml hasta aproximadamente 25,0 mg/ml, aproximadamente 25,0 mg/ml hasta aproximadamente 30,0 mg/ml, aproximadamente 30,0 mg/ml hasta aproximadamente 35,0 mg/ml, aproximadamente 35,0 mg/ml hasta aproximadamente 40,0 mg/ml, aproximadamente 40,0 mg/ml hasta aproximadamente 45,0 mg/ml, o aproximadamente 45,0 mg/ml hasta aproximadamente 50,0 mg/ml. En otras realizaciones, la composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo antagonista anti CD40 o su fragmento de unión al antígeno en una concentración de aproximadamente 15,0 mg/ml, aproximadamente 16,0 mg/ml, aproximadamente 17,0 mg/ml, aproximadamente 18,0 mg/ml, aproximadamente 19,0 mg/ml, aproximadamente 20,0 mg/ml, aproximadamente 21,0 mg/ml, aproximadamente 22,0 mg/ml, aproximadamente 23,0 mg/ml, aproximadamente 24,0 mg/ml, o aproximadamente 25,0 mg/ml. La composición farmacéutica líquida comprende el anticuerpo antagonista anti CD40, por ejemplo, el anticuerpo CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno y un tampón que mantiene el pH de la formulación en el intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, incluyendo aproximadamente pH 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, y otros valores semejantes dentro del intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0. En algunas realizaciones, el tampón mantiene el pH de la formulación en el intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 6,5, aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 6,0, aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 5,5, aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente 7,0, aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente pH 6,5, o aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente pH 6,0.

En la formulación puede usarse cualquier tampón adecuado que mantenga el pH de la formulación líquida del anticuerpo anti CD40 en el intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, siempre que la estabilidad fisicoquímica y la actividad biológica deseada del anticuerpo se mantengan como se señaló anteriormente en el presente documento. Los tampones incluyen, sin limitación, ácidos convencionales y sus sales, donde el contraión puede ser, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o magnesio. Los ejemplos de ácidos convencionales y su sales que pueden usarse para tamponar la formulación farmacéutica líquida incluyen, sin limitación, tampones de ácido succínico o succinato, ácido cítrico o citrato, ácido acético o acetato, ácido tartárico o tartrato, ácido fosfórico o fosfato, ácido glucónico o gluconato, ácido glutámico o glutamato, ácido aspártico o aspartato, ácido maleico o maleato y ácido málico o malato. La concentración del tampón en la formulación puede ser desde aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 50 mM, incluyendo aproximadamente 1 mM, 2 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, u otros valores semejantes dentro del intervalo de aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 50 mM. En algunas realizaciones, la concentración del tampón en la formulación es desde aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 15 mM, incluyendo aproximadamente 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, u otros valores semejantes dentro del intervalo de aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 15 mM.

En algunas realizaciones de la invención, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo antagonista anti CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR 12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno y tampón succinato o tampón citrato a una concentración que mantiene el pH de la formulación en el intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, preferentemente aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 6,5. Por "tampón succinato" o "tampón citrato" se entiende un tampón que comprende una sal de ácido succínico o una sal de ácido cítrico, respectivamente. En una realización preferente, el contraión de succinato o citrato es el catión sodio; así, el tampón es succinato de sodio o citrato de sodio, respectivamente. Sin embargo, se espera que sea eficaz cualquier catión. Otros posibles cationes de succinato o de citrato incluyen, sin limitación, potasio, amonio, calcio y magnesio. Como se señaló anteriormente, la concentración del tampón succinato o citrato en la formulación puede ser desde

aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 50 mM, incluyendo aproximadamente 1 mM, 2 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, u otros valores semejantes dentro del intervalo desde aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 50 mM. En algunas realizaciones, la concentración de tampón en la formulación va desde aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 15 mM, incluyendo aproximadamente 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, o aproximadamente 15 mM. En otras realizaciones, la formulación farmacéutica líquida comprende el anticuerpo antagonista anti CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 50,0 mg/ml, o aproximadamente 5,0 mg/ml hasta aproximadamente 25,0 mg/ml, y tampón succinato o citrato, por ejemplo, tampón succinato de sodio o citrato de sodio, a una concentración de aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 20 mM, aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 15 mM, de forma preferente de aproximadamente 10 mM.

Cuando es deseable que la formulación farmacéutica líquida sea prácticamente isotónica, la formulación farmacéutica líquida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo antagonista anti CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, y un tampón para mantener el pH de la formulación dentro del intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0 puede comprender además una cantidad de un agente de isotonicidad suficiente para hacer que la formulación sea prácticamente isotónica. Por "prácticamente isotónica" se entiende que la formulación acuosa tiene una osmolaridad de aproximadamente 240 mmol/kg hasta aproximadamente 360 mmol/kg, preferentemente aproximadamente 240 hasta aproximadamente 340 mmol/kg, más preferentemente aproximadamente 250 hasta aproximadamente 330 mmol/kg, aún más preferentemente aproximadamente 260 hasta aproximadamente 320 mmol/kg, de mayor preferencia aún aproximadamente 270 hasta aproximadamente 310 mmol/kg. Los procedimientos para determinar la isotonicidad de una disolución son conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Setnikar et al. (1959) J. Am. Pharm. Assoc. 48:628.

Los expertos en la técnica están familiarizados con una diversidad de solutos farmacéuticamente aceptables útiles para proporcionar isotonicidad en las composiciones farmacéuticas. El agente de isotonicidad puede ser cualquier reactivo capaz de ajustar la presión osmótica de la formulación farmacéutica líquida de la presente invención hasta un valor prácticamente igual al de un líquido corporal. Es deseable usar un agente de isotonicidad fisiológicamente aceptable. Por consiguiente, la formulación farmacéutica líquida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo antagonista anti CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, y un tampón para mantener el pH de la formulación dentro del intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, puede comprender además componentes que pueden usarse para proporcionar isotonicidad, por ejemplo, cloruro de sodio; aminoácidos tales como alanina, valina y glicina; azúcares y alcoholes de azúcares (polioles), incluidos, sin limitación, glucosa, dextrosa, fructosa, sacarosa, maltosa, manitol, trehalosa, glicerol, sorbitol y xilitol; ácido acético, otros ácidos orgánicos y sus sales, y cantidades relativamente menores de citratos o fosfatos. El experto en la técnica conocerá otros agentes que son adecuados para proporcionar la tonicidad óptima de la formulación líquida.

Preferentemente, en algunas realizaciones, la formulación farmacéutica líquida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antagonista anti CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, y un tampón para mantener el pH de la formulación dentro del intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0 comprende además cloruro de sodio como agente de isotonicidad. La concentración de cloruro de sodio en la formulación dependerá de la aportación de otros componentes a la tonicidad. En algunas realizaciones, la concentración de cloruro de sodio es aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 300 mM, aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 250 mM, aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 200 mM, aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 175 mM, aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 150 mM, aproximadamente 75 mM hasta aproximadamente 175 mM, aproximadamente 75 mM hasta aproximadamente 150 mM, aproximadamente 100 mM hasta aproximadamente 175 mM, aproximadamente 100 mM hasta aproximadamente 200 mM, aproximadamente 100 mM hasta aproximadamente 150 mM, aproximadamente 125 mM hasta aproximadamente 175 mM, aproximadamente 125 mM hasta aproximadamente 150 mM, aproximadamente 130 mM hasta aproximadamente 170 mM, aproximadamente 130 mM hasta aproximadamente 160 mM, aproximadamente 135 mM hasta aproximadamente 155 mM, aproximadamente 140 mM hasta aproximadamente 155 mM, o aproximadamente 145 mM hasta aproximadamente 155 mM. En una de tales realizaciones, la concentración de cloruro de sodio es aproximadamente 150 mM. En otra de tales realizaciones, la concentración de cloruro de sodio es aproximadamente 150 mM, el tampón es tampón succinato de sodio o citrato de sodio en una concentración de aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 15 mM, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo antagonista anti CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, y la formulación tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 6,0, o aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente pH 6,5. En otras realizaciones, la formulación farmacéutica líquida comprende el anticuerpo antagonista anti CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 50,0 mg/ml o aproximadamente 5,0 mg/ml hasta aproximadamente 25,0 mg/ml, aproximadamente 150 mM de cloruro de sodio, y aproximadamente 10 mM de succinato de sodio o citrato de sodio, a un pH de aproximadamente pH 5,5.

La degradación proteica por congelación, descongelación o cizallamiento mecánico durante el procesamiento de una formulación farmacéutica líquida de la revelación puede inhibirse incorporando tensioactivos en la formulación para disminuir la tensión superficial en la superficie de contacto disolución-aire. Así, en algunas realizaciones, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo antagonista anti CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR 5.9, o su fragmento de unión al antígeno, un tampón para mantener el pH de la formulación dentro del intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, y comprende además un tensioactivo. En otras realizaciones, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, un tampón para mantener el pH de la formulación dentro del intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, un agente de isotonicidad tal como cloruro de sodio en una concentración de aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 300 mM, y comprende además un tensioactivo.

Los tensioactivos típicos usados son tensioactivos noiónicos, incluidos los ésteres de polioxietilensorbitol tales como polisorbato 80 (Tween 80) y polisorbato 20 (Tween 20); ésteres de polioxipropileno-polioxietileno tales como Pluronic F68; alcoholes de polioxietileno tales como Brij 35; simeticona; polietilenglicol tal como PEG400; lisofosfatidilcolina; y polioxietileno-p-t-octilfenol tal como Triton X-100. La estabilización clásica de compuestos farmacéuticos por medio de tensioactivos o emulsionantes se describe, por ejemplo, en Levine et al. (1991) *J. Parenteral Sci. Technol.* 45(3): 160-165. Un tensioactivo preferentemente usado en la práctica de la presente invención es polisorbato 80. Cuando se incluye un tensioactivo, este se añade normalmente en una cantidad desde aproximadamente el 0,001 % hasta aproximadamente el 1,0 % (p/v), aproximadamente el 0,001 % hasta aproximadamente el 0,5 %, aproximadamente el 0,001 % hasta aproximadamente el 0,4 %, aproximadamente el 0,001 % hasta aproximadamente el 0,3 %, aproximadamente el 0,001 % hasta aproximadamente el 0,2 %, aproximadamente el 0,005 % hasta aproximadamente el 0,5 %, aproximadamente el 0,005 % hasta aproximadamente el 0,2 %, aproximadamente el 0,01 % hasta aproximadamente el 0,5 %, aproximadamente el 0,01 % hasta aproximadamente el 0,2 %, aproximadamente el 0,03 % hasta aproximadamente el 0,5 %, aproximadamente el 0,03 % hasta aproximadamente el 0,3 %, aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 0,5 %, o aproximadamente el 0,05 % hasta aproximadamente el 0,2 %.

Así, en algunas realizaciones, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo antagonista anti CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, el tampón es tampón succinato de sodio o citrato de sodio en una concentración de aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 50 mM, aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 25 mM, o aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 15 mM; la formulación tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 6,0, o aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente pH 6,5; y la formulación comprende además un tensioactivo, por ejemplo, polisorbato 80, en una cantidad desde aproximadamente el 0,001 % hasta aproximadamente el 1,0 % o aproximadamente el 0,001 % hasta aproximadamente el 0,5 %. Tales formulaciones pueden comprender opcionalmente un agente de isotonicidad, tal como cloruro de sodio en una concentración de aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 300 mM, aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 200 mM, o aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 150 mM. En otras realizaciones, la formulación farmacéutica líquida comprende el anticuerpo antagonista anti CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o CHIR-5.9, o su fragmento de unión al antígeno, en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 50,0 mg/ml o aproximadamente 5,0 mg/ml hasta aproximadamente 25,0 mg/ml, incluyendo aproximadamente 20,0 mg/ml; cloruro de sodio aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 200 mM, incluyendo cloruro de sodio aproximadamente 150 mM; succinato de sodio o citrato de sodio a una concentración de aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 20 mM; incluyendo succinato de sodio o citrato de sodio aproximadamente 10 mM; cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 200 mM, incluyendo aproximadamente 150 mM; y opcionalmente un tensioactivo, por ejemplo, polisorbato 80, en una cantidad desde aproximadamente el 0,001 % hasta aproximadamente el 1,0 %, incluyendo aproximadamente el 0,001 % hasta aproximadamente el 0,5 %; teniendo la formulación farmacéutica líquida un pH de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0, aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 6,0, aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 5,5, aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente pH 6,5, o aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente pH 6,0.

La formulación farmacéutica líquida puede estar esencialmente libre de conservantes y otros vehículos, excipientes, o estabilizadores señalados anteriormente en el presente documento. Como alternativa, la formulación puede incluir uno o más conservantes, por ejemplo, agentes antibacterianos, vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables descritos en el presente documento anteriormente con la condición de que no afecten de manera adversa la estabilidad fisicoquímica del anticuerpo antagonista anti CD40 o su fragmento de unión al antígeno. Los ejemplos de vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables incluyen, sin limitación, otros agentes tamponadores, codisolventes, tensioactivos, antioxidantes, incluidos ácido ascórbico y metionina, agentes quelantes tales como EDTA, complejos de metales (por ejemplo, complejos Zn-proteína), y polímeros biodegradables tales como poliésteres. Puede encontrarse una exposición detallada de formulación y selección de vehículos, excipientes e isomolitos farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences (18ª ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pensilvania, 1990).

Una vez que la formulación farmacéutica líquida u otra composición farmacéutica descritas en el presente documento están preparadas, pueden liofilizarse para evitar la degradación. Los procedimientos para liofilizar composiciones líquidas son conocidos por los expertos en la técnica. Inmediatamente antes de usar, la composición puede reconstituirse con un diluyente estéril (disolución de Ringer, agua destilada o disolución salina, por ejemplo) que puede incluir otros componentes. Tras la reconstitución, la composición se administra a los sujetos preferentemente usando los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

### **Uso de anticuerpos anti CD40 antagonistas en la fabricación de medicamentos**

La presente revelación también proporciona el uso de un anticuerpo antagonista anti CD40 o su fragmento de unión al antígeno en la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto de un cáncer caracterizado por un crecimiento de células B neoplásicas, en el que el medicamento está coordinado con un tratamiento que usa un anticuerpo anti CD20 o un fragmento del mismo de unión al antígeno. Tales cánceres incluyen, sin limitación, los cánceres relacionados con células B presentados más arriba en el presente documento, por ejemplo linfoma no hodgkiniano, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, linfoma de células B, linfoma de células B de grado alto, linfoma de células B de grado intermedio, linfoma de células B de grado bajo, leucemia linfoblástica aguda de células B, leucemia mieloblástica, enfermedad de Hodgkin, plasmacitoma, linfoma folicular, linfoma folicular de células pequeñas hendidas, linfoma folicular de células grandes, linfoma folicular mixto de células pequeñas hendidas, linfoma difuso de células pequeñas hendidas, linfoma linfocítico difuso de células pequeñas, leucemia prolinfocítica, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de zona marginal, linfoma del tejido linfoide asociado con mucosas, linfoma monocitoide de células B, linfoma esplénico, leucemia de células peludas, linfoma difuso de células grandes, linfoma mediastínico de células B grandes, granulomatosis linfomatoide, linfomatosis intravascular, linfoma difuso de células mixtas, linfoma difuso de células grandes, linfoma inmunoblástico, linfoma de Burkitt, linfoma relacionado con el sida y linfoma de células del manto.

Por "coordinado" se entiende que el medicamento que comprende el anticuerpo antagonista anti CD40 o el fragmento del mismo de unión al antígeno ha de usarse antes, durante o después del tratamiento del sujeto usando un anticuerpo anti CD20 o un fragmento del mismo de unión al antígeno. En una realización tal, la presente revelación también se relaciona con el uso del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o el CHIR-5.9 en la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer relacionado con las células B en un sujeto, en la que el medicamento está coordinado con un tratamiento que usa un anticuerpo anti CD20, por ejemplo rituximab (Rituxan®), o un fragmento del mismo de unión al antígeno, en la que el medicamento ha de usarse antes, durante o después del tratamiento del sujeto usando un anticuerpo anti CD20 o un fragmento del mismo de unión al antígeno.

En algunas realizaciones, el medicamento que comprende el anticuerpo antagonista anti CD40, por ejemplo el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o el CHIR-5.9 dado a conocer en el presente documento, o el fragmento del mismo de unión al antígeno está coordinado con un tratamiento que usa un anticuerpo anti CD20 o un fragmento del mismo de unión al antígeno y al menos otro tipo de terapia contra el cáncer. Ejemplos de otras terapias contra el cáncer incluyen, sin limitación, las descritas anteriormente en este documento, es decir, cirugía; terapia con radiación; quimioterapia, opcionalmente en combinación con trasplante autólogo de médula ósea; incluyendo los agentes quimioterapéuticos adecuados, sin limitación, fludarabina o fosfato de fludarabina, clorambucilo, vincristina, pentostatina, 2-clorodesoxiadenosina (cladribina), ciclofosfamida, doxorubicina, prednisona, y sus combinaciones, por ejemplo regímenes que contienen antraciclina tales como CAP (ciclofosfamida, doxorubicina más prednisona), CHOP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona más doxorubicina), VAD (vincristina, doxorubicina más dexametasona), MP (melfalán más prednisona) y otros agentes citotóxicos y/o terapéuticos usados en quimioterapia tales como mitoxantrona, daunorrubicina, idarrubicina, asparaginasa y antimetabolitos, incluidos, sin limitación, citarabina, metotrexato, 5-fluorouracilo decarbacina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina y nelarabina; otra terapia anticancerosa con anticuerpos monoclonales (por ejemplo, alemtuzumab (Campath®) u otro anticuerpo anti CD52 dirigido a la glicoproteína de superficie celular CD52 en células B malignas; anticuerpo anti CD19 (por ejemplo, MT103, un anticuerpo biespecífico); anticuerpo anti CD22 (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal humanizado epratuzumab); bevacizumab (Avastin®) u otro anticuerpo anticanceroso dirigido al factor de crecimiento vascular endotelial humano; anticuerpo anti CD22 dirigido al antígeno CD22 en células B malignas (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal BL-22, una toxina alfaCD22); anticuerpo  $\alpha$ -M-CSF dirigido al factor estimulante de colonias de macrófagos; anticuerpos dirigidos al activador del receptor del factor kappaB nuclear (RANK) y su ligando (RANKL), que están sobreexpresadas en el mieloma múltiple; anticuerpo anti CD23 dirigido al antígeno CD23 en células B malignas (por ejemplo, IDEC-152); anticuerpo anti CD80 dirigido al antígeno CD80 (por ejemplo, IDEC-114); anticuerpo anti CD38 dirigido al antígeno CD38 en células B malignas; anticuerpos dirigidos a los receptores del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (anticuerpos anti MHC) expresados en células B malignas; otros anticuerpos anti CD40 (por ejemplo, SGN-40) dirigidos al antígeno CD40 en células B malignas; y anticuerpos dirigidos al receptor 1 del ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL-R1) (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal agonista humano HGS-ETR1) y TRAIL-R2 expresado en varios tumores sólidos y tumores de origen hematopoyético); terapia del cáncer basada en moléculas pequeñas, incluidos, sin limitación, inhibidores de microtúbulos y/o topoisomerasa (por ejemplo, el inhibidor mitótico dolastatina y análogos de dolastatina; el agente de unión a tubulina T900607; XL119; y el inhibidor de la topoisomerasa aminocamptotecina), SDX-105 (clorhidrato de bendamustina), ixabepilona (un análogo de epotilona, también llamado BMS-247550), inhibidores de la proteína quinasa C, por ejemplo, midostaurina ((PKC-412, CGP 41251, N-benzoilestaurosporina),



5 pioxantrona, eloxatina (un agente antineoplásico), ganite (nitrato de galio), Thalomid® (talidomida), derivados  
 inmunomoduladores de la talidomida (por ejemplo, revlimid (anteriormente revimid)), Affinitak™ (inhibidor antisentido  
 de la proteína quinasa C-alfa), SDX-101 (R-etodolac, que induce la apoptosis de linfocitos malignos), análogos de  
 10 nucleósidos purina de segunda generación, tales como clofarabina, inhibidores de la producción de la proteína Bcl-2  
 por células cancerosas (por ejemplo, los agentes antisentido oblimersen y Genasense®), inhibidores de proteasoma  
 (por ejemplo, Velcade™ (bortezomib)), inhibidores de quinasas de molécula pequeña (por ejemplo, CHIR-258),  
 inhibidores de VEGF de molécula pequeña (por ejemplo, ZD-6474), inhibidores de la proteína del choque térmico  
 (HSP) 90 de molécula pequeña (por ejemplo, 17-AAG), agentes inhibidores de desacetilasas de histonas de  
 15 molécula pequeña (por ejemplo, HPC híbrido/polar de citodiferenciación HPC) tales como ácido  
 suberanilohidroxámico (SAHA), y FR-901228) y agentes apoptóticos tales como Trisenox® (trío xido de arsénico) y  
 Xcytrin® (motexafina gadolinio); terapias contra el cáncer basadas en vacunas/inmunoterapia, incluyendo, sin  
 limitación, enfoques de vacunas (por ejemplo, Id-KLH, oncofago, vtaletina), inmunoterapia personalizada o  
 inmunoterapia activa de idiotipo (por ejemplo, MyVax® Personalized Immunotherapy, denominada formalmente  
 20 GTOP-99), Promune® (CpG 7909, un agonista sintético para el receptor de tipo *toll* 9 (TLR9)), terapia con interferón  
 alfa, terapia con interleucina 2 (IL-2), terapia con IL-12, terapia con IL-15 y terapia con IL-21; terapia con esteroides;  
 u otra terapia contra el cáncer; en las que el tratamiento con el anticuerpo anti CD20 o el fragmento del mismo de  
 unión al antígeno y la terapia adicional contra el cáncer o las terapias adicionales contra el cáncer ocurren antes,  
 durante o después del tratamiento del sujeto con el medicamento que comprende el anticuerpo antagonista anti  
 25 CD40 o el fragmento del mismo de unión al antígeno, tal como se ha hecho notar más arriba en el presente  
 documento. Cuando el medicamento que comprende el anticuerpo antagonista anti CD40 o el fragmento del mismo  
 de unión al antígeno está coordinado con el tratamiento que usa un anticuerpo anti CD20 o un fragmento del mismo  
 de unión al antígeno y al menos otra terapia contra el cáncer, el uso del medicamento puede ser antes, durante o  
 después del tratamiento del sujeto con cualquiera de las dos o con ambas terapias adicionales contra el cáncer.

25 También se da a conocer en el presente documento el uso de una combinación sinérgica de un anticuerpo  
 antagonista anti CD40 o de un fragmento del mismo de enlace al antígeno en la fabricación de un medicamento para  
 tratar a un sujeto de un cáncer caracterizado por un crecimiento de células B neoplásicas, incluyendo los cánceres  
 relacionados con células B descritos en el presente documento más arriba, en el que el medicamento está  
 coordinado con el tratamiento usando un anticuerpo anti CD20 o un fragmento del mismo de unión al antígeno. Por  
 30 “combinación sinérgica” se entiende que el medicamento comprende una cantidad del anticuerpo antagonista anti  
 CD40 o del fragmento del mismo de unión al antígeno que permite un efecto terapéutico sinérgico cuando el  
 medicamento está coordinado con un tratamiento que usa un anticuerpo anti CD20 o un fragmento del mismo de  
 unión al antígeno de la manera expuesta más arriba en el presente documento. “Efecto terapéutico sinérgico” se  
 refiere a un efecto terapéutico observado con una combinación de dos o más terapias (en este caso, la terapia con  
 el anticuerpo antagonista anti CD40 y la terapia con anticuerpos anti CD20) en el que el efecto terapéutico (según se  
 35 mide por cualquiera de varios parámetros, incluyendo las medidas de eficacia descritas más arriba en el presente  
 documento) es mayor que la suma de los respectivos efectos terapéuticos individuales observados con las respectivas  
 terapias individuales.

40 En una realización tal, la revelación se relaciona con el uso de una combinación sinérgica del anticuerpo monoclonal  
 CHIR-12.12 o CHIR-5.9 en la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer relacionado con células B en un  
 sujeto, en el que el medicamento está coordinado con un tratamiento que usa un anticuerpo anti CD20, por ejemplo  
 rituximab (Rituxan®), o un fragmento del mismo de unión al antígeno, en el que el medicamento ha de usarse antes,  
 durante o después del tratamiento del sujeto usando el anticuerpo anti CD20 o el fragmento del mismo de unión al  
 antígeno. En algunas realizaciones, el medicamento que comprende la combinación sinérgica del anticuerpo  
 45 antagonista anti CD40, por ejemplo el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o el CHIR-5.9 dados a conocer en el  
 presente documento, o el fragmento del mismo de unión al antígeno está coordinado con un tratamiento que usa un  
 anticuerpo anti CD20, por ejemplo rituximab (Rituxan®), o un fragmento del mismo de unión al antígeno y al menos  
 otro tipo de terapia contra el cáncer, como se ha hecho notar más arriba en el presente documento.

50 La revelación también se relaciona con el uso de un anticuerpo antagonista anti CD40, por ejemplo el anticuerpo  
 monoclonal CHIR-12.12 o el CHIR-5.9, dados a conocer en el presente documento, o el fragmento del mismo de  
 unión al antígeno en la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto de un cáncer caracterizado por un  
 crecimiento de células B neoplásicas, incluyendo los cánceres relacionados con células B, descritos más arriba en  
 el presente documento, en el que el medicamento se usa en un sujeto que ha sido pretratado con un anticuerpo anti  
 CD20, por ejemplo rituximab (Rituxan®), o un fragmento del mismo de unión al antígeno. Por “pretratado” o  
 55 “tratamiento previo” se entiende que el sujeto ha recibido terapia con anticuerpos anti CD20 (es decir, ha sido tratado  
 usando un anticuerpo anti CD20 o un fragmento del mismo de unión al antígeno) antes de recibir el medicamento  
 que comprende el anticuerpo antagonista anti CD40 o el fragmento del mismo de unión al antígeno. “Pretratado” o  
 “tratamiento previo” incluyen a sujetos que han sido tratados usando un anticuerpo anti CD20 o un fragmento del  
 mismo de unión al antígeno variante del mismo, solo o en combinación con otras terapias contra el cáncer, en el  
 60 plazo de 2 años, en el plazo de 18 meses, en el plazo de 1 año, en el plazo de 6 meses, en el plazo de 2 meses, en  
 el plazo de 6 semanas, en el plazo de 1 mes, en el plazo de 4 semanas, en el plazo de 3 semanas, en el plazo de 2  
 semanas, en el plazo de 1 semana, en el plazo de 6 días, en el plazo de 5 días, en el plazo de 4 días, en el plazo de  
 3 días, en el plazo de 2 días, o incluso en el plazo de 1 día antes del inicio del tratamiento con el medicamento que  
 comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista, por ejemplo el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o el CHIR-5.9

dados a conocer en el presente documento, o su fragmento de unión al antígeno. No es necesario que el sujeto haya sido un paciente que respondiese al tratamiento previo con la anterior terapia con anticuerpos anti CD20, o a la anterior terapia con anticuerpos anti CD20 y otras terapias contra el cáncer. Así el sujeto que recibe el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD40 antagonista o su fragmento de unión al antígeno podría haber respondido, o podría no haber respondido (o sea, el cáncer fue refractario) al tratamiento previo con la anterior terapia con anticuerpos anti CD20, o a una o más terapias anteriores contra el cáncer en las que el tratamiento previo comprendía múltiples terapias contra el cáncer, una de las cuales era una terapia con anticuerpos anti CD20, por ejemplo una terapia con anticuerpos anti CD20 y cirugía; terapia con anticuerpos anti CD20 y quimioterapia; terapia con anticuerpos anti CD20 y terapia con IL-2; o terapia con anticuerpos anti CD20, quimioterapia y terapia con IL-2.

Así, en algunas realizaciones, la revelación se relaciona con el uso de un anticuerpo antagonista anti CD40, por ejemplo el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o el CHIR-5.9 dados a conocer en el presente documento, o el fragmento del mismo de unión al antígeno en la fabricación de un medicamento que de usarse en un sujeto necesitado de tratamiento de un cáncer caracterizado por un crecimiento de células B neoplásicas, como el descrito más arriba en el presente documento, en el que el sujeto ha sido tratado previamente con terapia con anticuerpos anti CD20 y una o más de las siguientes terapias adicionales contra el cáncer: cirugía; terapia con radiación; quimioterapia, opcionalmente en combinación con trasplante autólogo de médula ósea; incluyendo los agentes quimioterapéuticos adecuados, sin limitación, fludarabina o fosfato de fludarabina, clorambucilo, vincristina, pentostatina, 2-clorodesoxiadenosina (cladribina), ciclofosfamida, doxorubicina, prednisona, y sus combinaciones, por ejemplo regímenes que contienen antraciclina tales como CAP (ciclofosfamida, doxorubicina más prednisona), CHOP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona más doxorubicina), VAD (vincristina, doxorubicina más dexametasona), MP (melfalán más prednisona) y otros agentes citotóxicos y/o terapéuticos usados en quimioterapia tales como mitoxantrona, daunorrubicina, idarrubicina, asparaginasa y antimetabolitos, incluidos, sin limitación, citarabina, metotrexato, 5-fluorouracilo decarbacina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina y nelarabina; otra terapia anticancerosa con anticuerpos monoclonales (por ejemplo, alemtuzumab (Campath®) u otro anticuerpo anti CD52 dirigido a la glicoproteína de superficie celular CD52 en células B malignas; anticuerpo anti CD19 (por ejemplo, MT103, un anticuerpo biespecífico); anticuerpo anti CD22 (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal humanizado epratuzumab); bevacizumab (Avastin®) u otro anticuerpo anticanceroso dirigido al factor de crecimiento vascular endotelial humano; anticuerpo anti CD22 dirigido al antígeno CD22 en células B malignas (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal BL-22, una toxina alfaCD22); anticuerpo  $\alpha$ -M-CSF dirigido al factor estimulante de colonias de macrófagos; anticuerpos dirigidos al activador del receptor del factor kappaB nuclear (RANK) y su ligando (RANKL), que están sobreexpresadas en el mieloma múltiple; anticuerpo anti CD23 dirigido al antígeno CD23 en células B malignas (por ejemplo, IDEC-152); anticuerpo anti CD80 dirigido al antígeno CD80 (por ejemplo, IDEC-114); anticuerpo anti CD38 dirigido al antígeno CD38 en células B malignas; anticuerpos dirigidos a los receptores del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (anticuerpos anti MHC) expresados en células B malignas; otros anticuerpos anti CD40 (por ejemplo, SGN-40) dirigidos al antígeno CD40 en células B malignas; y anticuerpos dirigidos al receptor 1 del ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL-R1) (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal agonista humano HGS-ETR1) y TRAIL-R2 expresado en varios tumores sólidos y tumores de origen hematopoyético); terapia del cáncer basada en moléculas pequeñas, incluidos, sin limitación, inhibidores de microtúbulos y/o topoisomerasa (por ejemplo, el inhibidor mitótico dolastatina y análogos de dolastatina; el agente de unión a tubulina T900607; XL119; y el inhibidor de la topoisomerasa aminocamptotecina), SDX-105 (clorhidrato de bendamustina), ixabepilona (un análogo de epotilona, también llamado BMS-247550), inhibidores de la proteína quinasa C, por ejemplo, midostaurina ((PKC-412, CGP 41251, N-benzoilestaurosporina), pixantrona, eloxatina (un agente antineoplásico), ganite (nitrato de galio), Thalomid® (talidomida), derivados inmunomoduladores de la talidomida (por ejemplo, revlimid (anteriormente revimid)), Affinitak™ (inhibidor antisentido de la proteína quinasa C-alfa), SDX-101 (R-etodolac, que induce la apoptosis de linfocitos malignos), análogos de nucleósidos purina de segunda generación, tales como clofarabina, inhibidores de la producción de la proteína Bcl-2 por células cancerosas (por ejemplo, los agentes antisentido oblimersen y Genasense®), inhibidores de proteasoma (por ejemplo, Velcade™ (bortezomib)), inhibidores de quinasas de molécula pequeña (por ejemplo, CHIR-258), inhibidores de VEGF de molécula pequeña (por ejemplo, ZD-6474), inhibidores de la proteína del choque térmico (HSP) 90 de molécula pequeña (por ejemplo, 17-AAG), agentes inhibidores de desacetilasas de histonas de molécula pequeña (por ejemplo, HPC híbrido/polar de citodiferenciación HPC) tales como ácido suberanilohidroxámico (SAHA), y FR-901228) y agentes apoptóticos tales como Trisenox® (tríoóxido de arsénico) y Xcytrin® (motexafina gadolinio); terapias contra el cáncer basadas en vacunas/inmunoterapia, incluyendo, sin limitación, enfoques de vacunas (por ejemplo, Id-KLH, oncofago, vialatina), inmunoterapia personalizada o inmunoterapia activa de idiotipo (por ejemplo, MyVax® Personalized Immunotherapy, denominada formalmente GTOP-99), Promune® (CpG 7909, un agonista sintético para el receptor de tipo *toll* 9 (TLR9)), terapia con interferón alfa, terapia con interleucina 2 (IL-2), terapia con IL-12, terapia con IL-15 y terapia con IL-21; terapia con esteroides; u otra terapia contra el cáncer.

La revelación también se relaciona con el uso de un anticuerpo anti CD20 o un fragmento del mismo de unión al antígeno en la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto de un cáncer caracterizado por un crecimiento de células B neoplásicas, incluyendo el cáncer relacionado con células B, en el que el medicamento está coordinado con el tratamiento usando un anticuerpo antagonista anti CD40 o un fragmento del mismo de unión al antígeno. En estas realizaciones, se pretende que "coordinado" signifique que el medicamento que comprende el anticuerpo anti

CD20 o el fragmento del mismo de unión al antígeno ha de usarse antes, durante o después del tratamiento del sujeto usando el anticuerpo antagonista anti CD40 o el fragmento del mismo de unión al antígeno. En una realización tal, la revelación se relaciona con el uso de un anticuerpo anti CD20, por ejemplo rituximab (Rituxan®), o un fragmento del mismo de unión al antígeno en la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto de un cáncer caracterizado por un crecimiento de células B neoplásicas, como un cáncer relacionado con células B, en el que el medicamento está coordinado con el tratamiento que usa el anticuerpo monoclonal CHIR 12.12 o el CHIR-5.9, en el que el medicamento ha de usarse antes, durante o después del tratamiento del sujeto con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o el CHIR-5.9.

En algunas realizaciones, el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD20, por ejemplo rituximab (Rituxan®), o un fragmento del mismo de unión al antígeno, está coordinado con un tratamiento que usa un anticuerpo antagonista anti CD40 o un fragmento del mismo de unión al antígeno, por ejemplo el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 o el CHIR-5.9, o el fragmento del mismo de unión al antígeno, y al menos otro tipo de terapia contra el cáncer. Ejemplos de otras terapias contra el cáncer incluyen, sin limitación, las descritas anteriormente en este documento, es decir, cirugía; terapia con radiación; quimioterapia, opcionalmente en combinación con trasplante autólogo de médula ósea; incluyendo los agentes quimioterapéuticos adecuados, sin limitación, fludarabina o fosfato de fludarabina, clorambucilo, vincristina, pentostatina, 2-clorodesoxiadenosina (cladribina), ciclofosfamida, doxorubicina, prednisona, y sus combinaciones, por ejemplo regímenes que contienen antraciclina tales como CAP (ciclofosfamida, doxorubicina más prednisona), CHOP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona más doxorubicina), VAD (vincristina, doxorubicina más dexametasona), MP (melfalán más prednisona) y otros agentes citotóxicos y/o terapéuticos usados en quimioterapia tales como mitoxantrona, daunorubicina, idarubicina, asparaginasa y antimetabolitos, incluidos, sin limitación, citarabina, metotrexato, 5-fluorouracilo decarbacina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina y nelarabina; otra terapia anticancerosa con anticuerpos monoclonales (por ejemplo, alemtuzumab (Campath®) u otro anticuerpo anti CD52 dirigido a la glicoproteína de superficie celular CD52 en células B malignas; anticuerpo anti CD19 (por ejemplo, MT103, un anticuerpo biespecífico); anticuerpo anti CD22 (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal humanizado epratuzumab); bevacizumab (Avastin®) u otro anticuerpo anticanceroso dirigido al factor de crecimiento vascular endotelial humano; anticuerpo anti CD22 dirigido al antígeno CD22 en células B malignas (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal BL-22, una toxina alfaCD22); anticuerpo  $\alpha$ -M-CSF dirigido al factor estimulante de colonias de macrófagos; anticuerpos dirigidos al activador del receptor del factor kappaB nuclear (RANK) y su ligando (RANKL), que están sobreexpresadas en el mieloma múltiple; anticuerpo anti CD23 dirigido al antígeno CD23 en células B malignas (por ejemplo, IDEC-152); anticuerpo anti CD80 dirigido al antígeno CD80 (por ejemplo, IDEC-114); anticuerpo anti CD38 dirigido al antígeno CD38 en células B malignas; anticuerpos dirigidos a los receptores del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (anticuerpos anti MHC) expresados en células B malignas; otros anticuerpos anti CD40 (por ejemplo, SGN-40) dirigidos al antígeno CD40 en células B malignas; y anticuerpos dirigidos al receptor 1 del ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL-R1) (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal agonista humano HGS-ETR1) y TRAIL-R2 expresado en varios tumores sólidos y tumores de origen hematopoyético); terapia del cáncer basada en moléculas pequeñas, incluidos, sin limitación, inhibidores de microtúbulos y/o topoisomerasa (por ejemplo, el inhibidor mitótico dolastatina y análogos de dolastatina; el agente de unión a tubulina T900607; XL119; y el inhibidor de la topoisomerasa aminocamptotecina), SDX-105 (clorhidrato de bendamustina), ixabepilona (un análogo de epotilona, también llamado BMS-247550), inhibidores de la proteína quinasa C, por ejemplo, midostaurina ((PKC-412, CGP 41251, N-benzoilestaurosporina), pixantrona, eloxatina (un agente antineoplásico), ganite (nitrate de galio), Thalomid® (talidomida), derivados inmunomoduladores de la talidomida (por ejemplo, revlimid (anteriormente revimid)), Affinitak™ (inhibidor antisentido de la proteína quinasa C- $\alpha$ ), SDX-101 (R-etodolac, que induce la apoptosis de linfocitos malignos), análogos de nucleósidos purina de segunda generación, tales como clofarabina, inhibidores de la producción de la proteína Bcl-2 por células cancerosas (por ejemplo, los agentes antisentido oblimersen y Genasense®), inhibidores de proteasoma (por ejemplo, Velcade™ (bortezomib)), inhibidores de quinasas de molécula pequeña (por ejemplo, CHIR-258), inhibidores de VEGF de molécula pequeña (por ejemplo, ZD-6474), inhibidores de la proteína del choque térmico (HSP) 90 de molécula pequeña (por ejemplo, 17-AAG), agentes inhibidores de desacetilasas de histonas de molécula pequeña (por ejemplo, HPC híbrido/polar de citodiferenciación HPC) tales como ácido suberanilohidroxámico (SAHA), y FR-901228) y agentes apoptóticos tales como Trisenox® (trióxido de arsénico) y Xcytrin® (motexafina gadolinio); terapias contra el cáncer basadas en vacunas/inmunoterapia, incluyendo, sin limitación, enfoques de vacunas (por ejemplo, Id-KLH, oncofago, vitalina), inmunoterapia personalizada o inmunoterapia activa de idiotipo (por ejemplo, MyVax® Personalized Immunotherapy, denominada formalmente GTOP-99), Promune® (CpG 7909, un agonista sintético para el receptor de tipo *toll* 9 (TLR9)), terapia con interferón alfa, terapia con interleucina 2 (IL-2), terapia con IL-12, terapia con IL-15 y terapia con IL-21; terapia con esteroides; u otra terapia contra el cáncer; en las que el tratamiento con el anticuerpo antagonista anti CD40 o el fragmento del mismo de unión al antígeno y la terapia adicional contra el cáncer o las terapias adicionales contra el cáncer ocurren antes, durante o después del tratamiento del sujeto con el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD20 o el fragmento del mismo de unión al antígeno, tal como se ha hecho notar más arriba en el presente documento. Cuando el medicamento que comprende el anticuerpo anti CD20 o un fragmento del mismo de unión al antígeno está coordinado con el tratamiento que usa un anticuerpo antagonista anti CD40 o el fragmento del mismo de unión al antígeno y al menos otra terapia contra el cáncer, el uso del medicamento puede ser antes, durante o después del tratamiento del sujeto con cualquiera de las dos o con ambas terapias adicionales contra el cáncer.

“Tratamiento” en el contexto del uso coordinado de un medicamento descrito en el presente documento con otra u otras terapias contra el cáncer se define en el presente documento como la aplicación o administración del medicamento o de la otra terapia contra el cáncer a un sujeto, o la aplicación o administración del medicamento u otra terapia contra el cáncer a un tejido aislado o a una línea celular de un sujeto, en el que el sujeto tiene un cáncer caracterizado por un crecimiento de células B neoplásicas, un síntoma asociado con tal cáncer, o una predisposición a desarrollar tal cáncer, siendo la finalidad sanar, calmar, mitigar, alterar, remediar, aliviar, mejorar o afectar al cáncer, cualquier síntoma asociado del cáncer, o la predisposición a desarrollar el cáncer.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a título de ilustración y no como limitación.

## **PARTE EXPERIMENTAL**

### *Introducción*

Los anticuerpos anti CD40 antagonistas usados en los ejemplos a continuación son CHIR-5.9 y CHIR-12.12. Los anticuerpos anti CD40 CHIR-5.9 y CHIR-12.12 son anticuerpos monoclonales (mAb) anti CD40 humano del subtipo IgG1 humana generados por inmunización de ratones transgénicos que portan el *locus* de cadena pesada de IgG1 humana y el *locus* de cadena ligera  $\kappa$  humana (tecnología XenoMouse®; Abgenix; Fremont, California). Se usaron como inmunógeno células de insecto SF9 que expresan el dominio extracelular CD40.

De forma resumida, se fusionaron esplenocitos de ratones inmunizados con células de mieloma murino SP 2/0 o P 3 x 63Ag8.653 en una relación de 10:1 usando polietilenglicol al 50 %, como está descrito previamente por de Boer et al. (1988) J. Immunol. Meth. 113:143. Las células fusionadas se resuspendieron en medio IMDM completo suplementado con hipoxantina (0,1 mM), aminopterina (0,01 mM), timidina (0,016 mM) e hIL-6 a 0,5 ng/ml (Genzyme, Cambridge, Massachusetts). A continuación, se distribuyeron las células fusionadas entre los pocillos de placas de cultivo tisular de 96 pocillos, de manera que cada una contenía como promedio 1 hibridoma en crecimiento.

Tras 10-14 días se analizaron los sobrenadantes de las poblaciones de hibridomas para detectar la producción de anticuerpos específicos. Para la detección de anticuerpos específicos por los clones de hibridoma, se combinaron los sobrenadantes de cada pocillo y se probaron para especificidad de actividad anti-CD 40 por ELISA en primer lugar. A continuación se usaron los positivos para tinción fluorescente celular de las células B transformadas con VEB usando un ensayo FACS estándar. Las células de hibridomas positivos se clonaron dos veces por dilución limitante en IMDM/FBS que contenía hIL-6 a 0,5 ng/ml.

Se fusionaron un total de 31 bazos de ratones con las células SP2/0 de mieloma de ratón para generar 895 anticuerpos que reconocen el CD40 recombinante en ELISA. Como promedio, aproximadamente el 10 % de los hibridomas producidos usando tecnología Abgenix XenoMouse® (Abgenix; Fremont, California) pueden contener la cadena ligera lambda de ratón en lugar de la cadena kappa humana. Se seleccionaron y descartaron los anticuerpos que contenían cadena ligera lambda de ratón. Se seleccionó un subconjunto de 260 anticuerpos que también mostraban unión al CD40 de superficie celular para su análisis ulterior. Los hibridomas estables seleccionados durante una serie de procedimientos de subclonación se usaron para una caracterización ulterior en ensayos de unión y funcionales.

Se identificaron clones de otros 7 hibridomas que tenían actividad antagonista. En base a su potencia antagonista relativa y a sus actividades de ADCC, se seleccionaron dos clones de hibridoma para su posterior evaluación (Tabla 1 a continuación). Se denominan 131.2F8.5.9 (5.9) y 153.8E2.D10.D6.12.12 (12.12).

Tabla 1. Resumen del conjunto inicial de datos con anticuerpos de IgG1 anti CD40 CHIR-5.9 y CHIR-12.12.

Hibridoma madre	Clones de hibridoma	Unión a la superficie celular	Antagonista	ADCC	CDC	Nº CMCC	Secuencia de ADN de la región V
131.2F5	131.2F5.8.5.9	+++	+++	++	-	12047	Sí
153.8E2	153.8E2D10D6.12.12	+++	+++	++++	-	12056	Sí

La línea del hibridoma de ratón 131.2F8.5.9 (CMCC nº 12047) y la línea de hibridoma 153.8E2.D10.D6.12.12 (CMCC nº 12056) se han depositado en la American Type Culture Collection [ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209 (EE. UU)] con los números de Depósito de Patente PTA-5542 y PTA-5543, respectivamente.

Los ADNc que codifican las regiones variables de los anticuerpos candidato se amplificaron por PCR, se clonaron y se secuenciaron. Las secuencias de aminoácido para la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo CHIR-12.12 se presentan en las Figuras 2A y 2B, respectivamente. Véanse también la SEC ID nº 2 (cadena ligera para mAb CHIR-12.12) y la SEC ID nº 4 (cadena pesada para mAb CHIR-12.12). En la Figura 2B se muestra una variante de la cadena pesada para mAb CHIR-12.12 (véase también la SEC ID nº 5), que difiere de la SEC ID nº 4 porque tiene un residuo alanina sustituido por un 20 residuo serina en la posición 153 de la SEC ID nº 4. Las secuencias de nucleótidos que codifican la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo CHIR-12.12 se presentan en las

Figuras 3A y 3B, respectivamente. Véase también la SEC ID nº 1 (secuencia codificadora para cadena ligera para mAb CHIR-12.12) y la SEC ID nº 3 (secuencia codificadora para cadena pesada para mAb CHIR-12.12). Las secuencias de aminoácidos para la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo CHIR-5.9 se presentan en las Figuras 4A y 4B, respectivamente. Véanse también la SEC ID nº 6 (cadena ligera para mAb CHIR-5.9) y la SEC ID nº 7 (cadena pesada para mAb CHIR-5.9). En la Figura 3B se muestra una variante de la cadena pesada para mAb CHIR-5.9 (véase también la SEC ID nº 8), que difiere de la SEC ID nº 7 porque tiene un residuo alanina sustituido por un residuo serina en la posición 158 de la SEC ID nº 7.

Como se espera para los anticuerpos derivados de hibridomas independientes, hay una variación sustancial en las secuencias de nucleótidos en las regiones determinantes de complementariedad (CDR). Se cree que la diversidad en la región de CDR3 de V<sub>H</sub> determina de manera significativa la especificidad del anticuerpo.

Como se muestra por medio del análisis FACS, CHIR-5.9 y CHIR-12.12 se unen específicamente al CD40 humano y pueden prevenir la unión del ligando de CD40. Ambos mAb pueden competir con la unión previa del ligando de CD40 al CD40 de la superficie celular. La afinidad de unión de CHIR-5.9 al CD40 humano es de  $1.2 \times 10^{-8}$  M y la afinidad de unión de CHIR-12.12 al CD40 humano es de  $5 \times 10^{-10}$  M.

Los anticuerpos monoclonales CHIR-12.12 y CHIR-5.9 son fuertes antagonistas e inhiben la proliferación mediada por ligando de CD40 *in vitro* de células B normales; así mismo inhiben la proliferación mediada por ligando de CD40 *in vitro* de células de cáncer en pacientes de NHL y CLL. *In vitro*, ambos anticuerpos matan células de cáncer primarias de pacientes de NHL por ADCC. Se observó actividad antitumoral dependiente de la dosis en un modelo de linfoma humano de xenoinjerto.

Ejemplo 1: La combinación del mAb CHIR-12.12 y Rituxan® muestra actividad antitumoral contra el linfoma de Burkitt resistente al Rituxan® en un modelo de xenoinjerto

Se probaron en un modelo murino combinaciones del anticuerpo monoclonal quimérico anti CD20 rituximab (Rituxan®; IDEC-C2B8; IDEC Pharmaceuticals Corp., San Diego, California) y del anticuerpo monoclonal antagonista anti CD40 CHIR-12.12. Específicamente, se sometió a 120 ratones nu/nu hembra (Charles River Laboratories, Wilmington, Massachusetts) de 5 semanas a un periodo de aclimatación de al menos 7 días. Un día antes de la inoculación de células tumorales, los ratones recibieron una irradiación de 3 Gy usando una unidad de irradiación Gammacell 40 de cesio 137 fabricada por Atomic Energy of Canada. Se cultivaron células Namalwa (ATCC, Manassas, Virginia), línea celular de linfoma de Burkitt agresivo resistente al Rituxan®, en medio RPMI 1640 con suero fetal bovino al 15 %. En el día de la inoculación, las células fueron cosechadas, contadas y resuspendidas en 50 % de HBSS + 50 % de matrigel con una densidad de  $5 \times 10^7$  células/mL. Las células tumorales se inocularon de forma subcutánea en el ijar derecho a  $5 \times 10^6$  células/100µl/ratón.

Un día después de la inoculación del tumor, los ratones fueron seleccionados al azar e inyectados de forma intraperitoneal (i.p.) una vez cada 7 días (q7d) con mAb CD40 CHIR-12.12 y Rituxan® según se indica a continuación:

- a. IgG1, 10 mg/kg, i.p., q7d, × hasta 5 dosis.
- b. Rituxan®, 10 mg/kg, i.p., q7d, × hasta 5 dosis.
- c. Rituxan®, 20 mg/kg, i.p., q7d, × hasta 5 dosis.
- d. CHIR-12.12, 5 mg/kg, i.p., q7d, × hasta 5 dosis.
- e. CHIR-12.12, 10 mg/kg, i.p., q7d, × hasta 5 dosis.
- f. Rituxan®, 10 mg/kg + IgG1, 5 mg/kg, i.p., q7d, × hasta 5 dosis.
- g. Rituxan®, 10 mg/kg + CHIR-12.12, 5 mg/kg, i.p., q7d, × hasta 5 dosis.
- h. Rituxan®, 10 mg/kg + IgG1, 10 mg/kg, i.p., q7d, × hasta 5 dosis.
- i. Rituxan®, 10 mg/kg + CHIR-12.12, 10 mg/kg, i.p., q7d, × hasta 5 dosis.

El volumen del tumor fue medido dos veces por semana usando un calibre electrónico. Cuando la media del volumen del tumor en un grupo alcanzó 2000 mm<sup>3</sup>, se sacrificaron los ratones de ese grupo. Si el tumor en el grupo en tratamiento respondía, se guardaban los ratones hasta que el volumen medio del tumor alcanzase 2000 mm<sup>3</sup>.

Se usó ANOVA para analizar la diferencia del volumen medio del tumor entre todos los grupos. Se usó la comparación múltiple de Tuckey de las medias de los mínimos cuadrados para comparar la diferencia del volumen medio del tumor entre dos grupos específicos.

Según se muestra en la Figura 1, el crecimiento primario del tumor fue inhibido significativamente por medio de la administración i.p. de CHIR-12.12 por sí solo a razón de 5 mg/kg una vez por semana en un lapso de hasta 5 semanas (60 %, P=0,02). El CHIR-12.12 administrado por sí solo a 10 mg/kg mostró una tendencia hacia una inhibición significativa del volumen del tumor (39 %, P=0,22). El Rituxan® por sí solo a 10 mg/kg y 20 mg/kg no inhibió el crecimiento del tumor en absoluto. La combinación de CHIR-12.12 y Rituxan® dio como resultado una inhibición del crecimiento del tumor sinérgica y dependiente de la dosis de CHIR-12.12, con una inhibición del volumen del tumor del 77 % (P=0,001) y del 83 % (P=0,003) para CHIR-12.12 a 5 mg/kg más Rituxan® a 10 mg/kg, y CHIR-12.12 a 10 mg/kg y Rituxan® a 10 mg/kg, respectivamente. No se observó ningún signo de toxicidad entre ninguno de los animales tratados sometidos a las dosis y regímenes actuales. Estos datos sugieren que el mAb CHIR-12.12 por sí solo es un agente terapéutico para el linfoma agresivo y resistente al Rituxan®. Sin embargo, cuando se usó en combinación con Rituxan®, el mAb CHIR-12.12 fue más eficaz que el mAb CHIR-12.12 solo, el Rituxan® solo o la suma de las eficacias de estos dos mAb usados por sí solos.

#### Ejemplo 2: CHIR-5.9 y CHIR-12.12 se unen a un epítipo diferente que 15B8 en CD40

Los anticuerpos monoclonales candidatos CHIR-5.9 y CHIR-12.12 compiten entre sí por la unión al CD40 pero no con 15B8, un mAb de IgG2 anti CD40 (véase el documento de Publicación Internacional nº WO 02/28904). Se diseñaron estudios de unión competitiva de anticuerpos usando Biacore con chips biosensores CM5 con proteína A inmovilizada por medio de acoplamiento de aminas, que se usó para capturar cualquier anti CD40, ya fuera CHIR-12.12 o 15B8. Se observaron las curvas de unión de asociación/disociación normales con concentraciones variables de CD40-his (datos no mostrados). Para los estudios de competición, se capturaron CHIR-12.12 o 15B8 en la superficie de la proteína A. Subsiguientemente, se hizo fluir un complejo CD40-his / Fab de CHIR-5.9 (CD40 100 nM: Fab de CHIR-5.9 1 µM), en concentraciones variables, a través de la superficie modificada. En el caso de CHIR-12.12, no se observó asociación del complejo, lo que indica que CHIR-5.9 bloquea la unión de CHIR-12.12 a CD40-his. Para 15B8, se observó asociación del complejo Fab CHIR-5.9, lo que indica que CHIR-5.9 no bloquea la unión de 15B8 al sitio de unión de CD40. Sin embargo, la tasa de disociación del complejo aumentó drásticamente (datos no mostrados).

También se determinó que 15B8 y CHIR-12.12 no compiten por la unión de CD40-his. Este experimento se preparó capturando CHIR-12.12 en el chip biosensor de proteína A, bloqueando los sitios residuales de proteína A con hIgG<sub>1</sub> de control, uniendo CD40-his y, a continuación, haciendo fluir 15B8 sobre la superficie modificada. En efecto, el 15B8 se unió bajo estas condiciones, indicando que CHIR-12.12 no bloquea la unión de 15B8 al CD40.

#### Ejemplo 3: Propiedades de unión de los mAb CHIR-12.12 y CHIR-5.9

Se inmovilizó proteína A en chips biosensores CM5 a través de acoplamiento de aminas. Se capturaron anticuerpos monoclonales anti CD40 humanos, en una concentración de 1,5 µg/ml, sobre la superficie modificada del biosensor durante 1,5 minutos a 10 µl/min. Se hizo fluir CD40-his recombinante soluble sobre la superficie del biosensor en concentraciones variables. El anticuerpo y el antígeno se diluyeron en HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005 % (HBS-EP). Se determinaron las constantes cinéticas y de afinidad usando el soporte lógico Biaevaluation con un ajuste de interacción modelo/global de 1:1.

Como se muestra en la Tabla 2 a continuación, hay una diferencia de 121 veces en la tasa de disociación de CHIR-5.9 y CHIR-12.12 que da como resultado una afinidad 24 veces mayor para CHIR-12.12.

Tabla 2. Resumen de las propiedades de unión de los anticuerpos anti CD40 CHIR-5.9 y CHIR-12.12.

Anticuerpo	Ka(M <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup> )	kd(sec <sup>-1</sup> )	KD(nM)
Anti CD40, CHIR-5.9	(12,35 ± 0,64) × 10 <sup>5</sup>	(15,0 ± 1,3) × 10 <sup>-3</sup>	12,15 ± 0,35
Anti CD40, CHIR-12.12	(2,41 ± 0,13) × 10 <sup>5</sup>	(1,24 ± 0,06) × 10 <sup>-4</sup>	0,51 ± 0,02

#### Ejemplo 4: Caracterización del epítipo para anticuerpos monoclonales CHIR-12.12 y CHIR-5.9

Para determinar la localización del epítipo en CD40 reconocido por los anticuerpos monoclonales CHIR-12.12 y CHIR-5.9, se realizaron análisis SDS-PAGE y transferencia Western. Se separó CD40 purificado (0,5 µg) en un gel NUPAGE al 4-12 % bajo condiciones reductoras y no reductoras, se transfirió a membranas PVDF, y se realizó el sondeo con anticuerpos monoclonales en una concentración de 10 µg/ml. Las transferencias se sondearon con IgG anti humano conjugada con fosfatasa alcalina y se desarrolló usando el sustrato estabilizado Azul Western® para fosfatasa alcalina (Promega).

Los resultados indican que el anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR12.12 reconoce epítopos tanto en la forma no reducida como en la forma reducida de CD40, exhibiendo la forma no reducida de CD40 mayor intensidad que la forma reducida de CD40 (Tabla 3; transferencias no mostradas). El hecho de que el reconocimiento fuera positivo para ambas formas de CD40 indica que este anticuerpo interactúa con un epítipo conformacional, parte del cual es una secuencia lineal. El anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 reconoce principalmente la forma no reducida de CD40, lo que sugiere que este anticuerpo interactúa principalmente con un epítipo conformacional (Tabla 3; transferencias no mostradas).

Tabla 3. Identificación de dominio.

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

5 Para realizar un mapa de la región antigénica en CD40, se clonaron los cuatro dominios extracelulares de CD40 y se expresaron en células de insecto como proteínas de fusión GST. La secreción de los cuatro dominios se aseguró con una señal de secreción GP67. El sobrenadante de las células de insecto se analizó por análisis SDS-PAGE y transferencia Western para identificar el dominio que contenía el epítipo.

El anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 reconoce un epítipo en el Dominio 2 tanto bajo condiciones reductoras como no reductoras (Tabla 4; transferencias no mostradas). Por el contrario, el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9 exhibe reconocimiento muy débil para el Dominio 2 (Tabla 4; transferencias no mostradas). Ninguno de estos anticuerpos reconoce los Dominios 1, 3 o 4 en este análisis.

10

Tabla 4. Análisis del dominio 2.

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

15

Para definir con más precisión el epítipo reconocido por el mAb CHIR-12.12, se sintetizaron péptidos del Dominio 2 extracelular de CD40, que corresponde a la secuencia PCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQKGTSETDTICT (residuos 61-104 de la secuencia mostrada en la SEC ID nº 10 o la SEC ID nº 12). Se generaron membranas de síntesis SPOT (Sigma) conteniendo treinta y cinco péptidos 10-meros con un desplazamiento de 1 aminoácido. Se realizó el análisis de transferencia Western con el mAb CHIR-12.12 y la anti IgG humana marcada con beta galactosidasa como anticuerpo secundario. Se desmontó la transferencia y se volvió a sondear con el mAb CHIR-5.9 para determinar la región reconocida por este anticuerpo.

20

Los análisis SPOT sondando con anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR-12.12 en una concentración de 10 µg/ml dieron reacciones positivas con las transferencias 18 a 22. La región de la secuencia cubierta por estos péptidos se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados de sondeo analítico SPOT con anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR-12.12.

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

25

Estos resultados corresponden a un epítipo lineal de: YCDPNL (residuos 82-87 de la secuencia mostrada en la SEC ID nº 10 o la SEC ID nº 12). Este epítipo contiene Y82, D84 y N86, que se ha predicho que están implicados en la interacción CD40-ligando de CD40.

30

Los análisis SPOT con mAb CHIR-5.9 mostraron un débil reconocimiento de los péptidos representados por las transferencias 20-22 mostradas en la Tabla 6, sugiriendo implicación de la región YCDPNLGL (residuos 82-89 de la secuencia mostrada en la SEC ID nº 10 o la SEC ID nº 12) en su unión a CD40. Debe señalarse que los mAb CHIR-12.12 y CHR-5.9 compiten entre sí por la unión a CD40 en el análisis BIACORE.

Tabla 6. Resultados de sondeo analítico SPOT con anticuerpo monoclonal anti CD40 CHIR-5.9.

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

Los epítopos lineales identificados por los análisis SPOT están dentro del módulo B1 de CD40. La secuencia del módulo B1 de CD40 es:

HKYCDPNLGLRVQKGTSETDTIC (residuos 80-103 de la SEC ID nº 10 o 12).

35

Dentro del epítipo lineal identificado para CHIR-12.12 está C83. Se sabe que este residuo de cisteína forma un enlace disulfuro con C103. Es probable que el epítipo conformacional del mAb CHIR-12.12 contenga este enlace disulfuro (C83-C103) y/o aminoácidos vecinos conformacionalmente próximos a C103.

Ejemplo 5: El CHIR-12.12 bloquea las vías de supervivencia y de señal de CD40 mediadas por CD40L en células B humanas normales

5 El ligando de CD40 soluble (CD40L) activa las células B e induce diversos aspectos de respuestas funcionales, incluidos el aumento de la supervivencia y la proliferación, y la activación de las vías de señales de NFκB, ERK/MAPK, PBK/Akt y p38. Además, la estimulación de CD40 mediada por CD40L proporciona señales de supervivencia por reducción de PARP escindida e inducción de proteínas antiapoptóticas, XIAP y Mcl-1, en células B normales. La estimulación de CD40 mediada por CD40L también recluta TRAF2 y TRAF3 para la unión al dominio citoplasmático de CD40.

10 Los siguientes estudios demuestran que el CHIR-12.12 inhibió directamente todos estos efectos de la estimulación en las células B humanas normales. Por ejemplo, el tratamiento con CHIR-12.12 dio como resultado el aumento de escisión de caspasa-9, caspasa-3 y PARP, así como la reducción de XIAP y Mcl-1 de una manera dependiente del tiempo y de la dosis, restaurando la apoptosis de las células B. El tratamiento con CHIR-12.12 también inhibió la fosforilación de IκB quinasa (IKK) α y β (vía de NFκB), ERK, Akt y p38 en respuesta a la estimulación de CD40 mediada por CD40L. Además, se encontró que CHIR-12.12 no desencadenó estos efectos apoptóticos sin la estimulación inicial de CD40 mediada por CD40L.

*El CHIR-12.12 inhibió la supervivencia mediada por el ligando de CD40 al inducir la escisión de PARP.*

20 En estos experimentos, se estimularon  $0,6 \times 10^6$  células B humanas normales de donantes sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95 %) con sCD40L 1 μg/ml (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, Reino Unido). A continuación se añadieron CHIR-12.12 (10 μg/ml) e IgG de control. Las células se recogieron a los 0 y 20 minutos, a las 2 horas, 6 horas, 18 horas y 26 horas. Se detectaron controles de caspasa 9 escindida, caspasa 3 escindida, PARP escindida y β actina en los lisados celulares por transferencia Western.

25 En resumen, se observó que la estimulación de CD40 mediada por CD40L proporcionó señales de supervivencia, ya que no dio lugar a aumentos de caspasa 9 escindida, caspasa 3 escindida o PARP escindida con el tiempo, indicando que las células no estaban sufriendo apoptosis. Sin embargo, el tratamiento con CHIR-12.12 dio como resultado un aumento de estos productos de escisión, indicando que el tratamiento con CHIR-12.12 anuló los efectos de la unión de CD40L en las señales de supervivencia en las células B normales estimuladas con sCD40L, restaurando la apoptosis de las células B (datos no mostrados).

*CHIR-12.12 inhibió la expresión de proteínas antiapoptóticas de "supervivencia".*

30 En estos experimentos, se estimularon  $0,6 \times 10^6$  células B humanas normales de donantes sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95 %) con sCD40L 1 μg/ml (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, Reino Unido). A continuación se añadió CHIR-12.12 (10 μg/ml) e IgG de control. Las células se recogieron a los 0 y 20 minutos, a las 2 horas, 6 horas, 18 horas y 26 horas. Se detectaron controles de Mcl-1, XIAP, CD40 y β actina en los lisados celulares por transferencia Western.

35 En resumen, la estimulación con sCD40L dio como resultado la expresión sostenida de Mcl-1 y XIAP con el tiempo. Sin embargo, el tratamiento de las células estimuladas con sCD40L con CHIR-12.12 dio como resultado una disminución en la expresión de estas proteínas con el tiempo (datos no mostrados). Dado que Mcl-1 y XIAP son señales de "supervivencia" capaces de bloquear la vía apoptótica, estos resultados demuestran que el tratamiento con CHIR-12.12 elimina el bloqueo contra la apoptosis en las células B normales estimuladas con sCD40L.

*El tratamiento con CHIR-12.12 inhibió la fosforilación de IKK α (Ser 180) e IKK β (Ser 181) en células B normales.*

40 En estos experimentos, se estimularon  $1,0 \times 10^6$  células B humanas normales de donantes sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95 %) con sCD40L 1 μg/ml (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, Reino Unido). A continuación se añadieron CHIR-12.12 (10 μg/ml) e IgG de control. Las células se recogieron a los 0 y 20 minutos. Se detectaron controles de IKK α (Ser 180) e IKK β (Ser 181) fosforilados y de IKK β total en los lisados celulares por transferencia Western.

45 En resumen, la estimulación por medio de sCD40L dio como resultado la fosforilación de IKK α (Ser 180) e IKK β (Ser 181) con el tiempo; sin embargo, el tratamiento con CHIR-12.12 anuló esta respuesta a la estimulación de sCD40L en las células B normales (datos no mostrados).

*El tratamiento con CHIR-12.12 inhibió la supervivencia mediada por ligando de CD40 de una manera dependiente de la dosis.*

50 En estos experimentos, se estimularon  $0,6 \times 10^6$  células B humanas normales de donantes sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95 %) con sCD40L 1 μg/ml (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, Reino Unido). A continuación se añadieron CHIR-12.12 (0,01, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0 μg/ml) e IgG de control. Las células se recogieron a las 24 horas. Se detectaron controles de PARP escindida y β actina en los lisados celulares por transferencia Western.



Brevemente, el tratamiento con CHIR-12.12 dio como resultado el aumento de escisión de PARP en células estimuladas con sCD40L de una manera dependiente de la dosis y, por consiguiente, anuló la vía de señales de supervivencia en las células B normales estimuladas con sCD40L (datos no mostrados).

5 *El CHIR-12.12 inhibió la expresión de proteínas antiapoptóticas de "supervivencia" de una manera dependiente de la dosis.*

En estos experimentos, se estimularon  $0,6 \times 10^6$  células B humanas normales de donantes sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95 %) con sCD40L 1  $\mu\text{g/ml}$  (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, Reino Unido). A continuación se añadieron CHIR-12.12 (0,5, 2 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) e IgG de control. Las células se recogieron a las 22 horas. Se detectaron controles de Mcl-1, XIAP, PARP escindida y  $\beta$  actina en los lisados celulares por transferencia Western.

10 Brevemente, el tratamiento con CHIR-12.12 redujo la expresión de Mcl-1 y XIAP y aumentó la expresión de PARP escindida en células estimuladas con sCD40L de una manera dependiente de la dosis y, por consiguiente, anuló estos bloqueos a la vía apoptótica en las células B normales estimuladas con sCD40L (datos no mostrados).

*El CHIR-12.12 no afectó la expresión de proteínas antiapoptóticas, PARP escindida y XIAP, en ausencia de señalización de CD40L soluble.*

15 En estos experimentos, se estimularon  $1,0 \times 10^6$  células B humanas normales de donantes sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95 %) con CHIR-12.12 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) y únicamente IgG de control (es decir, las células no se estimularon previamente con sCD40L antes de añadir el anticuerpo). Las células se recogieron a las 0, 4, 14 y 16 horas. Se detectaron controles de XIAP, PARP escindida y  $\beta$  actina en los lisados celulares por transferencia Western.

20 Brevemente, los resultados muestran que, sin estimulación de sCD40L, las células expresaron concentraciones aumentadas de PARP escindida, mientras que la expresión de XIAP permaneció constante, tanto en las células tratadas con IgG de control como en las tratadas con CHIR-12.12 (datos no mostrados). Estos datos indican que el CHIR-12.12 no desencadena apoptosis en las células B humanas normales sin estimulación de CD40L.

*El CHIR-12.12 inhibe la fosforilación de IKK $\alpha$  (Ser 180) e IKK $\beta$  (Ser 181), Akt, ERK y p38 en las células B normales.*

25 En estos experimentos, se privó de suero en un medio que contenía FBS al 1 % a  $1,0 \times 10^6$  células B humanas normales de donantes sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95 %) y se estimularon con sCD40L 1  $\mu\text{g/ml}$  (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, Reino Unido). Los cultivos se trataron con CHIR-12.12 (1 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) e IgG de control. Las células se recogieron a los 0 y 20 minutos. Se detectaron fosfo IKK $\alpha$ , fosfo IKK $\beta$ , IKK $\beta$  total, fosfo ERK, ERK total, fosfo Akt, Akt total, fosfo p38 y p38 total en los lisados celulares por transferencia Western.

30 En resumen, la estimulación con sCD40L dio como resultado aumentos en la fosforilación de IKK $\alpha/\beta$ , fosforilación de ERK, fosforilación de Akt y fosforilación de p38, llevando así a la supervivencia y/o proliferación de las células. El tratamiento de las células con CHIR-12.12 anuló los efectos de la estimulación de sCD40L en estas vías de señales en las células B normales (datos no mostrados).

*El CHIR 12.12 inhibe las vías de señales múltiples tales como PI3K y MEK /ERK en la cascada de señales de CD40.*

35 En estos experimentos, se privó de suero en un medio que contenía FBS al 1 % a  $1,0 \times 10^6$  células B humanas normales de donantes sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95 %) y se estimularon con sCD40L 1  $\mu\text{g/ml}$  (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, Reino Unido). Los cultivos se trataron también con CHIR-12.12 (1 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ), Wortmanin (un inhibidor de PI3K/Akt, 1 y 10  $\mu\text{M}$ ), LY 294002 (un inhibidor de PI3K/Akt; 10 y 30  $\mu\text{M}$ ) y PD 98095 (un inhibidor de MEK, 10 y 30  $\mu\text{g/ml}$ ). Las células se recogieron a los 0 y 20 minutos. Se detectaron fosfo ERK, fosfo Akt, Akt total, fosfo IKK $\alpha/\beta$  y total en los lisados celulares por transferencia Western.

En resumen, los resultados muestran que el CHIR-12.12 anuló la fosforilación de todas estas moléculas de transducción de señales, mientras que los inhibidores de transducción de señales mostraron solo anulación específica de las señales, indicando que el CHIR-12.12 probablemente inhibe en una etapa anterior a estas moléculas de transducción de señales mediadas por la estimulación por CD40L (datos no mostrados).

45 *El CHIR-12.12 inhibe la unión de las moléculas de señal TRAF2 y TRAF3 al dominio citoplasmático de CD40 en las células B normales.*

50 En estos experimentos, se privó de suero durante cuatro horas en medio que contenía FBS al 1 % a  $4,0 \times 10^6$  células B humanas normales de donantes sanos (porcentaje de pureza entre 85 y 95 %) y se estimularon con sCD40L 1  $\mu\text{g/ml}$  (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, Reino Unido) durante 20 minutos. Las células se recogieron a los 0 y 20 minutos. Se inmunoprecipitó CD40 usando anti CD40 policlonal (Santa Cruz Biotechnology, California), y se sondeó en una transferencia Western con mAb anti TRAF2 (Santa Cruz Biotechnology, California), mAb anti TRAF3 (Santa Cruz Biotechnology, California), y mAb anti CD40 (Santa Cruz Biotechnology, California).

En resumen, los resultados muestran que TRAF2 y TRAF3 precipitaron conjuntamente con CD40 tras la estimulación con sCD40L. Por el contrario, el tratamiento con CHIR-12.12 anuló la formación del complejo de señal CD40-TRAF2/3 en células B normales estimuladas con sCD40L. No hubo cambios en la expresión de CD40 (datos no mostrados).

- 5 Sin estar ligados por la teoría, los resultados de estos experimentos, y los resultados en los ejemplos resumidos anteriormente, indican que el anticuerpo CHIR 12.12 es un anticuerpo monoclonal antagonista anti CD40 de acción dual que tiene una combinación excepcional de atributos. Este anticuerpo monoclonal plenamente humano bloquea las vías de señales de CD40 mediadas por CD40L para la supervivencia y la proliferación de las células B; este antagonismo da lugar finalmente a la muerte celular. El CHIR-12.12 también media el reconocimiento y la unión por las células efectoras, iniciando la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Una vez que el CHIR-12.12 está unido a las células efectoras, se liberan las enzimas citolíticas, dando lugar a la apoptosis y la lisis de las células B. El CHIR-12.12 es un anticuerpo antitumoral más potente que rituximab cuando se compara en modelos de tumores preclínicos.

#### Ejemplo 6: Formulación farmacéutica líquida para anticuerpos antagonistas anti CD40

- 15 Es sabido que la estabilidad de las proteínas es sensible al pH de la solución, dado que la carga superficial de una proteína varía con el pH de la solución, lo que da como resultado la estabilización o la desestabilización. Así, los pH no óptimos de una formulación pueden alterar la interacción electrostática, lo que lleva a la degradación física de un anticuerpo antagonista anti CD40, como la agregación, la precipitación y similares. Un cambio en las condiciones del pH también podría causar la ruptura de los enlaces covalentes, lo que lleva a la degradación química, como la fragmentación, la desamidación y similares. Por lo tanto, este estudio fue diseñado para identificar un pH óptimo de la solución para minimizar la degradación del anticuerpo antagonista anti CD40 debida a la agregación, la fragmentación o la desamidación.

- 25 El objetivo de este estudio fue investigar los efectos del pH de la solución en la estabilidad del anticuerpo antagonista anti CD40 CHIR-12.12 por medio de procedimientos biofísicos y bioquímicos para seleccionar el entorno de disolución óptimo para este anticuerpo. Los resultados de calorimetría diferencial de barrido (DSC) mostraron que la estabilidad de la conformación del CHIR-12.12 es óptima en formulaciones que tienen un pH de 5,5-6,5. En base a una combinación de análisis SDS-PAGE, HPLC de exclusión por tamaño (SEC-HPLC) y HPLC de intercambio catiónico (CEX-HPLC), la estabilidad fisicoquímica del CHIR-12.12 es óptima a un pH de aproximadamente 5,0-5,5. En vista de estos resultados, una formulación farmacéutica líquida recomendada que comprende este anticuerpo es una formulación que comprende CHIR-12.12 en una concentración de aproximadamente 20 mg/ml formulada en aproximadamente 10 mM de succinato de sodio, en aproximadamente 150 mM de cloruro de sodio y que tiene un pH de aproximadamente pH 5,5.

#### **Materiales y procedimientos**

- 35 El anticuerpo CHIR-12.12 usado en los estudios de formulación es un anticuerpo monoclonal humano producido por un proceso de cultivo de células CHO. Este mAb tiene un peso molecular de 150 kDa y consiste en dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas unidas entre sí por enlaces disulfuro. Está dirigido contra el receptor de CD40 de la superficie celular en las células que expresan CD40, incluidas las células B normales y malignas, para el tratamiento de diversos tipos de cáncer y enfermedades autoinmunes/inflamatorias.

- 40 La sustancia del fármaco anti CD40 usada para este estudio fue un lote a granel de anti CD40 (CHIR-12.12) purificado obtenido de células CHO. La composición de la sustancia del fármaco era de anticuerpo CHIR-12.12 9,7 mg/ml en citrato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, a pH 6,5. La muestra de control en el estudio era la sustancia del fármaco recibida, seguida por congelación a  $\leq -60$  °C, descongelación a TA y prueba junto con muestras de estabilidad en los puntos temporales predeterminados. Las muestras de estabilidad se prepararon por diálisis de la sustancia del fármaco contra disoluciones de diferentes pH y la concentración de CHIR-12.12 en cada una de las muestras se determinó por UV 280, tal como se presenta en la Tabla 7.

Tabla 7. Formulaciones de CHIR-12.12.

Composición del tampón	pH	Concentración de CHIR-12.12 (mg/ml)
10 mM de citrato sódico, 150 mM de cloruro sódico	4,5	9,0
10 mM de succinato sódico, 150 mM de cloruro sódico	5,0	9,3
10 mM de succinato sódico, 150 mM de cloruro sódico	5,5	9,2
10 mM de citrato sódico, 150 mM de cloruro sódico	6,0	9,7
10 mM de citrato sódico, 150 mM de cloruro sódico	6,5	9,4
10 mM de fosfato sódico, 150mM de cloruro sódico	7,0	9,4
10 mM de fosfato sódico, 150mM de cloruro sódico	7,5	9,5
10 mM de glicina, 150 mM de cloruro sódico	9,0	9,5

La estabilidad fisicoquímica del anticuerpo CHIR-12.12 en las diversas formulaciones se ensayó usando los siguientes protocolos.

*Calorimetría diferencial de barrido (DSC)*

La estabilidad conformacional de diferentes muestras de formulaciones se controló usando un MicroCal VP-DSC tras calentar de 15 °C hasta 90 °C a razón de 1 °C/min.

*SDS-PAGE*

- 5 La fragmentación y la agregación fueron estimadas usando gel Tris-glicina al 4-20 % bajo condiciones no reductoras y reductoras. Las proteínas fueron detectadas por medio de tinción con azul Coomassie.

*Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC-HPLC)*

- 10 La fragmentación y la agregación de proteínas también fueron medidas por medio de un sistema de HPLC Water Alliance con una columna Tosohaas TSK-GEL 3000SWXL, con fosfato de sodio 100 mM, pH 7,0 como fase móvil a un caudal de 0,7 ml/min.

*Cromatografía de intercambio catiónico (CEX-HPLC)*

La degradación relacionada con el cambio de cargas se midió usando un sistema de HPLC Waters 600s con una columna Dionex Propac WCX-10, con HEPES 50 mM, pH 7,3 como fase móvil A y HEPES 50 mM que contenía NaCl 500 mM, pH 7,3 como fase móvil B a un caudal de 0,5 °C/min.

15 **Resultados y discusión***Estudio de estabilidad conformacional.*

- 20 El despliegue térmico del CHIR-12.12 reveló al menos dos transiciones térmicas, que representan probablemente el despliegue y la fusión de los dominios Fab y Fc, respectivamente. A temperaturas mayores, la proteína presumiblemente se agregó, dando lugar a la pérdida de la señal de DSC. Con la finalidad de seleccionar la formulación, se definió la temperatura de transición térmica más baja como la temperatura de fusión, T<sub>m</sub>, en este estudio. La Figura 6 muestra la temperatura de fusión térmica en función de los pH de las formulaciones. Las formulaciones a pH 5,5-6,5 proporcionaron un anti CD40 con estabilidad conformacional superior, como se demuestra por las temperaturas de fusión térmica más elevadas.

*Análisis SDS-PAGE.*

- 25 Las muestras de formulaciones de CHIR-12.12 a pH 4,5-9,0 fueron incubadas a 40 °C durante 2 meses y fueron sometidas al análisis SDS-PAGE (datos no mostrados). Bajo condiciones no reductoras, se observaron especies con peso molecular (PM) de 23 kDa y 2,7 kDa en formulaciones con pH superior a 5,5, y se observaron especies con PM de 51 kDa en todas las formulaciones, pero aparecieron menos a pH 5,0-5,5. Pudo verse una especie con PM de 100 kDa a pH 7,5 y pH 9,0.
- 30 Bajo condiciones reductoras, el CHIR-12.12 se redujo en cadenas pesadas y cadenas ligeras libres con PM de 50 kDa y 24 kDa, respectivamente. La especie de 100 kDa pareció no ser totalmente reducible y aumentó con el aumento del pH de la disolución, lo que sugiere que podría existir asociación covalente diferente de disulfuro en las moléculas. Como había otras especies con identidades desconocidas en SDS-PAGE, la comparación de estabilidad para cada formulación se basa en la pureza restante del CHIR-12.12. Las formulaciones a pH 5,0-6,0 proporcionaron un entorno más estable para CHIR-12.12. Se detectaron pocos agregados por medio de SDS-PAGE (datos no mostrados).
- 35

*Análisis SEC-HPLC.*

- 40 El análisis SEC-HPLC detectó el CHIR-12.12 intacto como la especie del pico principal, una especie de agregación como una especie de pico anterior separada de la especie del pico principal, una especie de fragmento grande como un pico meseta en la parte posterior de la especie del pico principal, y se detectaron especies de fragmentos pequeños posteriores a las especies del pico principal. Tras la incubación a 5 °C y 25 °C durante 3 meses, se detectaron cantidades insignificantes de fragmentos y agregados de proteínas (<1,0 %) en las formulaciones anteriores y las especies del pico principal de CHIR-12.12 siguieron teniendo más del 99 % de pureza (datos no mostrados). Sin embargo, se desarrollaron gradualmente fragmentos de proteína tras el almacenamiento a 40 °C y se formaron más fragmentos a pH 4,5 y pH 6,5-9,0, como se muestra en la Tabla 8. Tras incubar las formulaciones de CHIR-12.12 a 40 °C durante 3 meses, se detectó aproximadamente un 2-3 % de agregados en pH 7,5 y pH 9,0, mientras que se detectó menos del 1 % de agregados en las formulaciones a otros pH (datos no mostrados). Los resultados de SEC-HPLC indican que el CHIR-12.12 es más estable a un pH de aproximadamente 5,0-6,0.
- 45

50

Tabla 8. Resultados de SEC-HPLC de muestras de estabilidad de CHIR-12.12 en condiciones de almacenamiento en tiempo real y aceleradas.

Muestra	% Pico principal				% Fragmentos			
	t=0	40°C 1 m	40°C 2 m	40°C 3 m	t=0	40°C 1 m	40°C 2 m	40°C 3 m
Control	99,4	99,2	99,9	99,5	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
pH 4,5	99,4	93,2	86,0	81,3	<1,0	6,4	13,2	18,1
pH 5,0	99,8	98,7	91,3	89,2	<1,0	<1,0	7,8	10,2
pH 5,5	99,8	98,9	91,4	90,6	<1,0	<1,0	7,6	8,8
pH 6,0	99,6	97,7	90,4	87,3	<1,0	1,9	8,2	11,7
pH 6,5	99,3	93,4	89,0	86,9	<1,0	5,6	9,9	12,4
pH 7,0	99,2	93,9	87,4	85,1	<1,0	5,5	11,1	13,5
pH 7,5	99,1	92,8	84,4	81,9	<1,0	6,4	12,9	16,2
pH 9,0	99,3	82,4	61,6	50,6	<1,0	15,4	36,2	47,6

#### Análisis CEX-HPLC.

El análisis CEX-HPLC detectó el CHIR-12.12 intacto como la especie del pico principal, las variantes ácidas eluyeron más temprano que las especies del pico principal y las variantes de adición de lisina en el extremo C terminal eluyeron después de las especies de pico principal. La Tabla 9 muestra la dependencia de los porcentajes de las especies restantes de CHIR-12.12 del pico principal y las variantes ácidas en el pH de la disolución. La muestra de control ya contenía un alto grado de especies ácidas (~33 %), probablemente debido a los procesos de fermentación de etapa temprana y purificación. La susceptibilidad del CHIR-12.12 a las disoluciones de pH más alto se evidencia por dos hechos. En primer lugar, la muestra de la formulación inicial a pH 9 (t = 0) ya generaba 12 % más especies ácidas que el control. En segundo lugar, el porcentaje de especies ácidas aumentó bruscamente con el aumento del pH. La degradación relacionada con el cambio de cargas se debe probablemente a la desamidación. Los datos anteriores indican que este tipo de degradación del CHIR-12.12 se minimizó a un pH de aproximadamente 5,0-5,5.

Tabla 9. Porcentaje del área pico por CEX-HPLC para CHIR-12.12 en formulaciones de pH diferente en condiciones de almacenamiento en tiempo real y aceleradas.

Muestra	% Pico principal					% Variantes ácidas				
	t=0	5°C 3 m	25°C 3 m	40°C 1 m	40°C 2 m	t=0	5°C 3 m	25°C 3 m	40°C 1 m	40°C 2 m
Control	49,2	49,8	49,8	49,2	50,3	32,0	33,7	33,7	32,0	33,6
pH 4,5	48,5	49,7	43,7	39,7	30,0	32,5	32,6	38,0	44,2	56,4
pH 5,0	49,6	49,8	48,3	40,6	31,4	32,7	31,8	35,0	44,3	57,1
pH 5,5	50,7	50,3	48,1	40,0	30,2	32,6	31,8	37,8	48,9	63,3
pH 6,0	50,2	49,9	47,9	37,4	23,9	33,1	33,6	38,5	54,9	72,7
pH 6,5	49,4	49,9	42,3	29,7	14,6	33,3	33,6	47,7	65,2	84,6
pH 7,0	49,7	49,9	21,9	-	-	34,4	36,4	64,4	-	-
pH 7,5	49,3	48,3	12,7	-	-	35,5	40,1	79,2	-	-
pH 9,0	41,3	31,8	-	-	-	44,7	59,9	-	-	-

#### Conclusión

El pH tiene un efecto significativo en la estabilidad conformacional y fisicoquímica del CHIR-12.12. Se determinó que la degradación relacionada con el cambio de cargas es la principal vía de degradación para el CHIR-12.12, que se redujo al mínimo a pH 5,0-5,5. En base a los datos de estabilidad general, una formulación farmacéutica líquida recomendada que comprende este anticuerpo es una formulación que comprende CHIR 12.12 a una concentración de aproximadamente 20 mg/ml formulada en aproximadamente 10 mM de succinato de sodio, en aproximadamente 150 mM de cloruro de sodio, y que tiene un pH de aproximadamente 5,5.

#### Ejemplo 7: Estudios clínicos con CHIR-5.9 y CHIR-12.12

##### Objetivos clínicos

El objetivo general es proporcionar una terapia eficaz para tumores de células B haciendo de ellos dianas de una combinación de un anticuerpo antagonista anti CD40 y un anticuerpo anti CD20. Estos tumores incluyen el linfoma de células B, el linfoma linfocítico crónico (CLL), la leucemia linfoblástica aguda (ALL), el mieloma múltiple (MM), la macroglobulinemia de Waldenstrom y la enfermedad sistémica de Castleman. La señal para estas enfermedades se determina en la fase II aunque puede obtenerse alguna medición de actividad en la fase I. El anticuerpo antagonista anti CD40 inicial es el mAb CHIR-12.12, y el anticuerpo anti CD20 inicial es rituximab (Rituxan®). Investigaciones posteriores estudian los efectos combinados del mAb CHIR-12.12 o el CHIR-5.9 con otros anticuerpos anti CD20 que tienen las características de unión del rituximab.

**Fase I**

- Evaluar la seguridad y la farmacocinética: aumento de dosis de estos dos anticuerpos en sujetos con procesos malignos de células B.
- 5 • Elegir la dosis de cada anticuerpo en base a la seguridad, tolerabilidad y cambio en los marcadores séricos de las respectivas dianas, es decir, CD40 o CD20. En general se busca una DMT para cada uno de estos anticuerpos cuando se usan en combinación, pero pueden resultar adecuadas otras indicaciones de eficacia (agotamiento CD40+ y/o CD20+ células B, etc.) para el hallazgo de la dosis.
- 10 • Considerar más de una combinación de dosis específicamente para indicaciones diferentes; por ejemplo, la dosis de combinación para el CLL puede ser diferente del del NHL. Así, en la fase II puede ser necesario algún hallazgo de dosis.
- A los pacientes se les dosifica semanalmente una toma de muestras para farmacocinética (Pk) en tiempo real. Inicialmente, la dosis máxima permitida es un ciclo de 4 semanas. La Pk puede ser muy variable dependiendo de la enfermedad estudiada, de la densidad de CD40 y/o de CD20, etc.
- 15 • Este o estos ensayos están abiertos a sujetos con linfoma de células B, CLL y, potencialmente, otros procesos malignos de células B.
- La decisión para interrumpir o continuar los estudios se basa en la seguridad, la dosis y las pruebas preliminares de actividad antitumoral, particularmente de naturaleza sinérgica.
- La actividad de la terapia de combinación de anticuerpos, determinada por la tasa de respuesta, se determina en la fase II.
- 20 • Identificar la o las dosis para la fase II.

**Fase II**

- Se iniciarán varios ensayos en los tipos de tumor anteriormente mencionados, con concentración en el linfoma de células B, el CLL y el mieloma múltiple (MM). Pueden requerirse ensayos separados en el NHL de grado bajo y de grado intermedio/alto, puesto que el CD40 y/o el CD20 pueden tener diferente función, dependiendo del grado del linfoma. Pueden probarse más de una combinación de dosis de anticuerpos y más de un programa en una configuración aleatorizada de fase II.

En cada enfermedad, dirigirse a una población de que no ha respondido a la atención estándar actual:

- CLL: pacientes que hayan sido resistentes al Campath® y a la quimioterapia.
- NHL de grado bajo: fracasos del Rituxan® o CHOP-R.
- 30 • NHL intermedio: fracasos de CHOP-R.
- Mieloma múltiple: fracasos de la quimioterapia.
  - ✓ La decisión de interrumpir o continuar el estudio se basa en la prueba del concepto terapéutico en la fase II
  - ✓ Determinar si puede usarse un marcador sustituto como indicación temprana de la eficacia clínica
  - ✓ Identificar las dosis para la fase III

**Fase III**

La fase III dependerá de cuándo se detecta la señal en la fase II y de qué terapias competidoras se consideran como el estándar. Si la señal está en una etapa de la enfermedad en la que no hay estándar de terapia, entonces podría servir un estudio de un único brazo, bien controlado, como un ensayo fundamental. Si hay agentes competidores que se consideran estándares, entonces se realizan estudios directos.

40 **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Long, Li  
Luqman, Mohammad  
Yabannavar, Asha  
Zaror, Isabel

- 45 <120> Procedimientos de terapia para cánceres relacionados con células B  
<130> PP22244.002 (284270)  
<150> 60/613.885 <151> 2004-09-28

<150> 60/565.710 <151> 2004-04-27

<150> 60/525.579 <151> 2003-11-26

<150> 60/517.337 <151> 2003-11-04

<160> 12

5 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 720

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Secuencia de codificación para la cadena ligera del anticuerpo anti CD40 humano CHIR-12.12

<221> CDS

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

<400> 1

```

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

      1              5              10              15

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

              20              25              30

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

              35              40              45

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

              50              55              60

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

              65              70              75              80

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

              85              90              95

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

              100              105              110

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

              115              120              125

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

              130              135              140

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

              145              150              155              160

ctg  aat  aac  ttc  tat  ccc  aga  gag  gcc  aaa  gta  cag  tgg  aag  gtg  gat  528

```

# ES 2 367 892 T3

```

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys val Gln Trp Lys Val Asp
      165                                170                                175
aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac 576
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
      180                                185                                190
agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa 624
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
      195                                200                                205
gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag 672
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
      210                                215                                220
ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag 720
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys *
      225                                230                                235

```

<210> 2

<211> 239

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Cadena ligera del anticuerpo anti CD40 humano CHIR-12.12

<400> 2

```

Met Ala Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
  1                                5                                10                                15
Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Thr
      20                                25                                30
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
      35                                40                                45
Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys
      50                                55                                60
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Val Leu Ile Ser Leu Gly ser Asn Arg Ala
  65                                70                                75                                80
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
      85                                90                                95
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
      100                                105                                110
Cys Met Gln Ala Arg Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
      115                                120                                125
Val Asp Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
      130                                135                                140
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
  145                                150                                155                                160

```

# ES 2 367 892 T3

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

<210> 3

<211> 2016

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación para la cadena pesada del anticuerpo anti CD40 humano CHIR-12.12 (con intrones)

<400> 3

```

atggagtttg  ggctgagctg  ggttttcctt  gttgctat  taagagggtg  ccagtgtcag  60
gtgcagttgg  tggagtctgg  gggaggcgtg  gtccagcctg  ggaggtccct  gagactctcc  120
tgtgcagcct  ctggattcac  cttcagtagc  tatggcatgc  actgggtccg  ccaggetcca  180
ggcaaggggc  tggagtgggt  ggcagttata  tcatatgagg  aaagtaatag  ataccatgca  240
gactccgtga  agggccgatt  caccatctcc  agagacaatt  ccaagatcac  gctgtatctg  300
caaatgaaca  gcctcagaac  tgaggacacg  gctgtgtatt  actgtgcgag  agatgggggt  360
atagcagcac  ctgggcctga  ctactggggc  cagggaaacc  tggtcaccgt  ctctcagca  420
agtaccaagg  gcccatcctg  cttccccctg  gcgcccgcta  gcaagagcac  ctctgggggc  480
acagcgccc  tgggctgcct  ggtcaaggac  tacttccccg  aaccggtgac  ggtgtcgtgg  540
aactcaggcg  ccctgaccag  cggcgtgcac  accttccccg  ctgtctaca  gtctcagga  600
ctctactccc  tcagcagcgt  ggtgaccgtg  ccctccagca  gcttgggcac  ccagacctac  660
atctgcaacg  tgaatcacia  gccagcaac  accaagggtg  acaagagagt  tggtgagagg  720
ccagcacagg  gagggagggt  gtctgctgga  agccaggctc  agcgtcctg  cctggacgca  780
tcccggctat  gcagtcccag  tccagggcag  caaggcaggc  cccgtctgcc  tcttaccctg  840
gaggcctctg  cccgccccac  tcatgctcag  ggagagggtc  ttctggcttt  ttccccaggc  900
tctgggcagg  cacaggctag  gtgccctaa  cccaggccct  gcacacaaag  gggcagggtg  960
tgggctcaga  cctgccaaga  gccatatccg  ggaggaccct  gccctgacc  taagcccacc  1020
caaaggcca  aactctccac  tcctcagct  cggacaacct  ctctctccc  agattccagt  1080
aactccaat  cttctctctg  cagagcccaa  atcttgtgac  aaaactcaca  catgcccacc  1140
gtgccagggt  aagccagccc  aggcctcgcc  ctccagctca  aggcgggaca  ggtgccttag  1200
agtagcctgc  atccagggac  aggccccagc  cgggtgctga  cacgtccacc  tccatctctt  1260
cctcagcacc  tgaactcctg  gggggaccgt  cagtcttctt  cttcccccca  aaacccaagg  1320

```



ES 2 367 892 T3

```

acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg 1380
aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga 1440
caaagcccg gaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc 1500
tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc 1560
cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggtg gaccctggg gtgcgagggc 1620
cacatggaca gaggccggct cggcccaccc tctgcctga gaggaccgc tgtaccaacc 1680
tctgtcccta cagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atccccggag 1740
gagatgacca agaaccaggc cagcctgacc tgcttggc aaggttcta tcccagcgac 1800
atcgccgtg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1860
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1920
tggcagcagg ggaacgtctt ctcctgctcc gtgatgcctg aggtctgca caaccactac 1980
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatga 2016

```

<210> 4

<211> 469

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada del anticuerpo anti CD40 humano CHIR-12.12

<400> 4

```

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Arg Gly
1          5          10          15
Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
          20          25          30
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
          35          40          45
Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
          50          55          60
Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala
65          70          75          80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ile
          85          90          95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val
          100          105          110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr
          115          120          125
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
          130          135          140
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ala Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
145          150          155          160
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val

```

ES 2 367 892 T3

				165					170					175	
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
			180					185					190		
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val
			195				200					205			
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val
			210			215					220				
Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys
225					230					235					240
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu
				245				250						255	
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
			260				265						270		
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
			275				280						285		
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
			290			295					300				
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser
305					310					315					320
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
				325					330						335
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala
			340					345					350		
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro
			355				360					365			
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln
			370			375						380			
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala
385					390					395					400
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr
				405				410						415	
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu
			420					425					430		
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser
			435				440					445			
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser

450

455

460

Leu Ser Pro Gly Lys

465

<210> 5

<211> 469

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 5

5

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

ES 2 367 892 T3

225						230										240
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	
						245				250				255		
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	
						260				265				270		
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	
						275				280				285		
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	
						290				295				300		
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	
						305				310				315		
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	
						325				330				335		
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	
						340				345				350		
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	
						355				360				365		
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	
						370				375				380		
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	
						385				390				395		
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	
						405				410				415		
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	
						420				425				430		
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	
						435				440				445		
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	
						450				455				460		
Leu	Ser	Pro	Gly	Lys												
						465										

<210> 6  
 <211> 239  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cadena ligera del anticuerpo anti CD40 humano CHIR-5.9  
 <400> 6

5

Met Ala Leu Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Pro

ES 2 367 892 T3

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

<210> 7

<211> 474

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Cadena pesada del anticuerpo anti CD40 humano CHIR-5.9

<400> 7

Met	Gly	Ser	Thr	Ala	Ile	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Ala	Val	Leu	Gln	Gly
1				5				10					15		
Val	Cys	Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys

ES 2 367 892 T3

				20						25					30
Pro	Gly	Glu	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe
		35					40					45			
Thr	ser	Tyr	Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
	50					55					60				
Glu	Trp	Met	Gly	Ile	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser
65					70						75				80
Pro	Ser	Phe	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser
			85							90				95	
Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Thr	Ala	Ala	Gly	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr
		115					120					125			
Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser
	130					135					140				
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ala	Ser	Lys
145					150					155					160
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			165						170					175	
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			180						185				190		
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
		195					200					205			
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
	210					215					220				
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
225					230					235					240
Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			245						250					255	
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
			260					265					270		
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
		275					280					285			
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
	290					295					300				
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu

# ES 2 367 892 T3

305		310		315		320									
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
				325					330					335	
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
				340				345					350		
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	ser	Lys	Ala	Lys	Gly
				355				360					365		
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
				370				375					380		
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
				385				390					395		400
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
				405				410					415		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
				420				425					430		
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
				435				440					445		
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
				450				455					460		
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
				465				470							

<210> 8

<211> 474

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Cadena pesada de variante del anticuerpo anti CD40 humano CHIR-5.9

<400> 8

Met	Gly	Ser	Thr	Ala	Ile	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Ala	Val	Leu	Gln	Gly
1				5					10					15	
Val	Cys	Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys
				20				25					30		
Pro	Gly	Glu	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe
				35				40					45		
Thr	Ser	Tyr	Trp	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				50				55				60			
Glu	Trp	Met	Gly	Ile	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser
				65				70				75			80
Pro	Ser	Phe	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser

ES 2 367 892 T3

				85					90					95	
Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Thr	Ala	Ala	Gly	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr
		115						120				125			
Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser
	130						135				140				
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
145					150					155					160
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			165						170				175		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			180						185				190		
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
		195						200				205			
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
	210						215					220			
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
225					230					235					240
Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			245						250					255	
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
			260					265					270		
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
		275						280				285			
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
	290						295				300				
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
305					310					315					320
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			325						330					335	
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
		340						345					350		
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
		355						360				365			
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu



# ES 2 367 892 T3

370	375	380
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
385	390	395
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		400
	405	410
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		415
	420	425
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		430
	435	440
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		445
	450	455
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		460
465	470	

<210> 9

<211> 612

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(612)

<221> característica\_misc

10 <222> (0) ... (0)

<223> Secuencia de codificación para la isoforma corta del CD40 humano

<400> 9

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

ES 2 367 892 T3

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

<210> 10  
 <211> 203  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 10

5

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

# ES 2 367 892 T3

Ser	Glu	Thr	Asp	Thr	Ile	Cys	Thr	Cys	Glu	Glu	Gly	Trp	His	Cys	Thr
			100					105					110		
Ser	Glu	Ala	Cys	Glu	Ser	Cys	Val	Leu	His	Arg	Ser	Cys	Ser	Pro	Gly
		115					120					125			
Phe	Gly	Val	Lys	Gln	Ile	Ala	Thr	Gly	Val	Ser	Asp	Thr	Ile	Cys	Glu
	130					135					140				
Pro	Cys	Pro	Val	Gly	Phe	Phe	Ser	Asn	Val	Ser	Ser	Ala	Phe	Glu	Lys
145					150					155				160	
Cys	His	Pro	Trp	Thr	Arg	Ser	Pro	Gly	Ser	Ala	Glu	Ser	Pro	Gly	Gly
				165					170				175		
Asp	Pro	His	His	Leu	Arg	Asp	Pro	Val	Cys	His	Pro	Leu	Gly	Ala	Gly
			180						185				190		
Leu	Tyr	Gln	Lys	Gly	Gly	Gln	Glu	Ala	Asn	Gln					
		195						200							

<210> 11

<211> 834

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5 <220>

<221> CDS

<222> (1)...(834)

<221> característica misc

<222> (0) ... (0)

10 <223> Secuencia de codificación para la isoforma larga del CD40 humano

<400> 11

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

ES 2 367 892 T3

```

tca gaa aca gac acc atc tgc acc tgt gaa gaa ggc tgg cac tgt acg 336
Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
      100                      105                      110
agt gag gcc tgt gag agc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tcg ccc ggc 384
Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
      115                      120                      125
ttt ggg gtc aag cag att gct aca ggg gtt tct gat acc atc tgc gag 432
Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
      130                      135                      140
ccc tgc cca gtc ggc ttc ttc tcc aat gtg tca tct gct ttc gaa aaa 480
Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
      145                      150                      155                      160
tgt cac cct tgg aca agc tgt gag acc aaa gac ctg gtt gtg caa cag 528
Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln
      165                      170                      175
gca ggc aca aac aag act gat gtt gtc tgt ggt ccc cag gat egg ctg 576
Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu
      180                      185                      190
aga gcc ctg gtg gtg atc ccc atc atc ttc ggg atc ctg ttt gcc atc 624
Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile
      195                      200                      205
ctc ttg gtg ctg gtc ttt atc aaa aag gtg gcc aag aag cca acc aat 672
Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn
      210                      215                      220
aag gcc ccc cac ccc aag cag gaa ccc cag gag atc aat ttt ccc gac 720
Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp
      225                      230                      235                      240
gat ctt cct ggc tcc aac act gct gct cca gtg cag gag act tta cat 768
Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His
      245                      250                      255
gga tgc caa ccg gtc acc cag gag gat ggc aaa gag agt cgc atc tca 816
Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser
      260                      265                      270
gtg cag gag aga cag tga 834
Val Gln Glu Arg Gln *
      275

```

<210> 12  
 <211> 277  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 12

# ES 2 367 892 T3

Met	Val	Arg	Leu	Pro	Leu	Gln	Cys	Val	Leu	Trp	Gly	Cys	Leu	Leu	Thr
1				5					10					15	
Ala	Val	His	Pro	Glu	Pro	Pro	Thr	Ala	Cys	Arg	Glu	Lys	Gln	Tyr	Leu
			20					25					30		
Ile	Asn	Ser	Gln	Cys	Cys	Ser	Leu	Cys	Gln	Pro	Gly	Gln	Lys	Leu	Val
		35					40					45			
Ser	Asp	Cys	Thr	Glu	Phe	Thr	Glu	Thr	Glu	Cys	Leu	Pro	Cys	Gly	Glu
	50					55					60				
Ser	Glu	Phe	Leu	Asp	Thr	Trp	Asn	Arg	Glu	Thr	His	Cys	His	Gln	His
65					70					75					80
Lys	Tyr	Cys	Asp	Pro	Asn	Leu	Gly	Leu	Arg	Val	Gln	Gln	Lys	Gly	Thr
			85						90					95	
Ser	Glu	Thr	Asp	Thr	Ile	Cys	Thr	Cys	Glu	Glu	Gly	Trp	His	Cys	Thr
			100						105					110	
Ser	Glu	Ala	Cys	Glu	Ser	Cys	Val	Leu	His	Arg	Ser	Cys	Ser	Pro	Gly
		115						120					125		
Phe	Gly	Val	Lys	Gln	Ile	Ala	Thr	Gly	Val	Ser	Asp	Thr	Ile	Cys	Glu
130						135						140			
Pro	Cys	Pro	Val	Gly	Phe	Phe	Ser	Asn	Val	Ser	Ser	Ala	Phe	Glu	Lys
145					150						155				160
Cys	His	Pro	Trp	Thr	Ser	Cys	Glu	Thr	Lys	Asp	Leu	Val	Val	Gln	Gln
			165						170					175	
Ala	Gly	Thr	Asn	Lys	Thr	Asp	Val	Val	Cys	Gly	Pro	Gln	Asp	Arg	Leu
			180						185				190		
Arg	Ala	Leu	Val	Val	Ile	Pro	Ile	Ile	Phe	Gly	Ile	Leu	Phe	Ala	Ile
		195					200					205			
Leu	Leu	Val	Leu	Val	Phe	Ile	Lys	Lys	Val	Ala	Lys	Lys	Pro	Thr	Asn
	210					215						220			
Lys	Ala	Pro	His	Pro	Lys	Gln	Glu	Pro	Gln	Glu	Ile	Asn	Phe	Pro	Asp
225					230						235				240
Asp	Leu	Pro	Gly	Ser	Asn	Thr	Ala	Ala	Pro	Val	Gln	Glu	Thr	Leu	His
			245						250					255	
Gly	Cys	Gln	Pro	Val	Thr	Gln	Glu	Asp	Gly	Lys	Glu	Ser	Arg	Ile	Ser
			260					265					270		
Val	Gln	Glu	Arg	Gln											
		275													

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo antagonista anti CD40 o un fragmento del mismo de unión al antígeno para su uso en un procedimiento para tratar a un sujeto humano de un cáncer **caracterizado por** un crecimiento neoplásico de células B mediante terapia de combinación de anticuerpos con un anticuerpo anti CD20 o un fragmento del mismo de unión al antígeno, en el que dicho anticuerpo antagonista anti CD40 o dicho fragmento del mismo de unión al antígeno están seleccionados del grupo constituido por:
- (a) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo capaz de unirse con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5542, o con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5543;
- (b) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID nº 10 o en la SEC ID nº 12;
- (c) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID nº 10 o en la SEC ID nº 12; y
- (d) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que compiten con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5542 o el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5543 en un ensayo de unión competitiva.
2. El uso de una cantidad efectiva de un anticuerpo antagonista anti CD40 o un fragmento del mismo de unión al antígeno en la fabricación de un medicamento para ser usado para tratar a un sujeto humano de un cáncer **caracterizado por** un crecimiento neoplásico de células B mediante terapia de combinación de anticuerpos con un anticuerpo anti CD20 o un fragmento del mismo de unión al antígeno. en el que dicho anticuerpo antagonista anti CD40 o dicho fragmento del mismo de unión al antígeno están seleccionados del grupo constituido por:
- (a) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo capaz de unirse con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5542 o con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5543;
- (b) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID nº 10 o en la SEC ID nº 12;
- (c) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID nº 10 o en la SEC ID nº 12; y
- (d) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que compiten con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5542 o el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5543 en un ensayo de unión competitiva.
3. Un anticuerpo antagonista anti CD40 o un fragmento del mismo de unión al antígeno para su uso en un procedimiento para inhibir el crecimiento de un tumor que comprende células B neoplásicas mediante terapia de combinación de anticuerpos con un anticuerpo anti CD20 o un fragmento del mismo de unión al antígeno, en el que dicho anticuerpo antagonista anti CD40 o dicho fragmento del mismo de unión al antígeno están seleccionados del grupo constituido por:
- (a) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo capaz de unirse con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5542 o con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5543;
- (b) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID nº 10 o en la SEC ID nº 12;
- (c) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID nº 10 o en la SEC ID nº 12; y

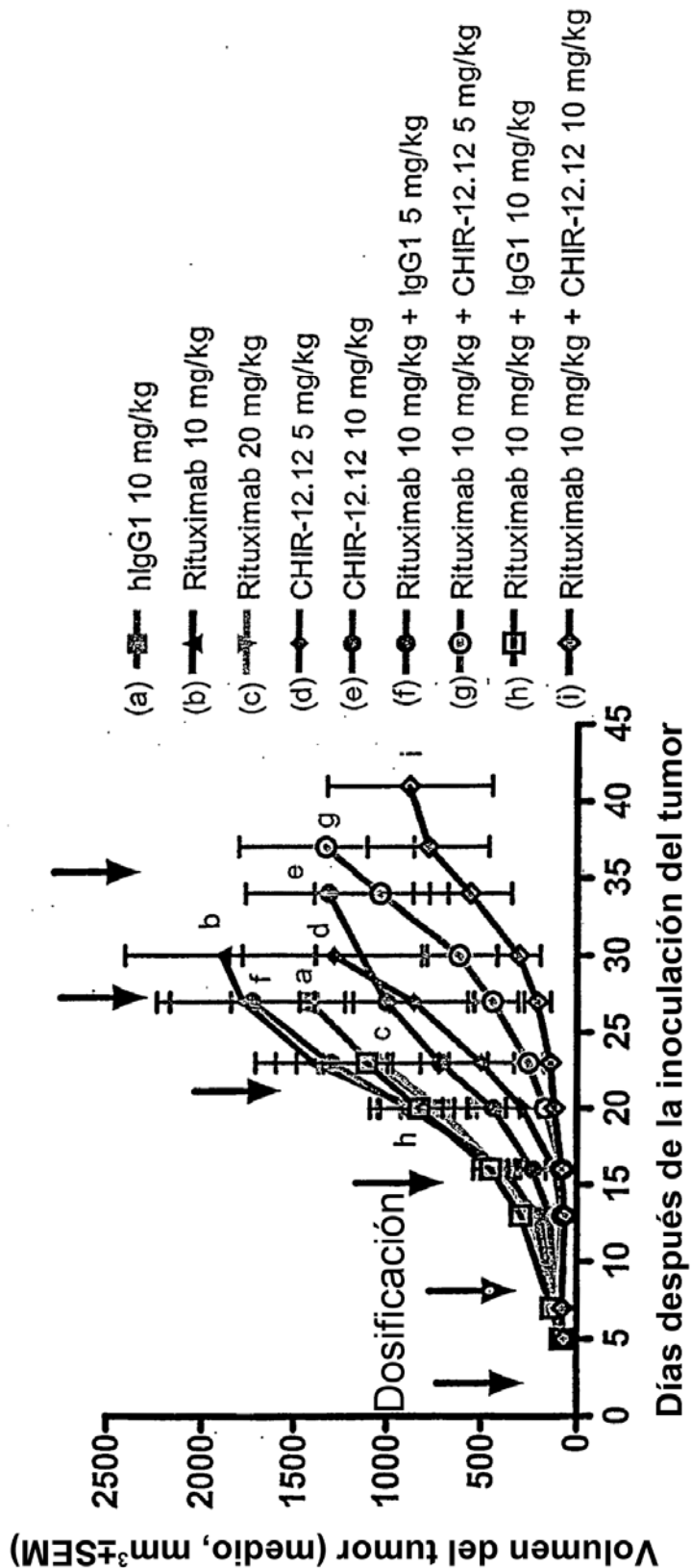
- (d) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que compiten con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5542 o el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5543 en un ensayo de unión competitiva.
- 5
4. El uso de una cantidad efectiva de un anticuerpo antagonista anti CD40 o un fragmento del mismo de unión al antígeno en la fabricación de un medicamento para ser usado para inhibir el crecimiento de un tumor que comprende células B neoplásicas mediante terapia de combinación de anticuerpos con un anticuerpo anti CD20 o un fragmento del mismo de unión al antígeno en el que dicho anticuerpo antagonista anti CD40 o dicho fragmento del mismo de unión al antígeno están seleccionados del grupo constituido por:
- 10
- (a) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo capaz de unirse con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5542 o con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5543;
- 15
- (b) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID nº 10 o en la SEC ID nº 12;
- (c) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID nº 10 o en la SEC ID nº 12; y
- 20
- (d) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que compiten con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5542 o el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5543 en un ensayo de unión competitiva.
- 25
5. Un procedimiento *in vitro* para inhibir el crecimiento de un tumor que comprende células B neoplásicas, que comprende poner en contacto dichas células con una cantidad efectiva de un anticuerpo antagonista anti CD40 o un fragmento del mismo de unión al antígeno en combinación con un anticuerpo anti CD20 o un fragmento del mismo de unión al antígeno, en el que dicho anticuerpo o dicho fragmento del mismo de unión al antígeno están seleccionados del grupo constituido por:
- 30
- (a) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo capaz de unirse con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5542 o con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5543;
- 35
- (b) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID nº 10 o en la SEC ID nº 12;
- (c) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que se unen con un epítipo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia de CD40 humano mostrada en la SEC ID nº 10 o en la SEC ID nº 12; y
- 40
- (d) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que compiten con el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5542 o el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5543 en un ensayo de unión competitiva.
- 45
6. El anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno, el uso o el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en los que dicho anticuerpo antagonista anti CD40 es un anticuerpo humano.
7. El anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno, el uso o el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en los que dicho anticuerpo o dicho fragmento del mismo de unión al antígeno están seleccionados del grupo constituido por:
- 50
- (i) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que comprenden un dominio variable de cadena ligera que contiene los residuos de la región determinante de la complementariedad (CDR) de la SEC ID nº 2 o de la SEC ID nº 6;
- (ii) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que comprenden un dominio variable de cadena pesada que contiene los residuos de la región determinante de la complementariedad (CDR) de la SEC ID nº 4 o de la SEC ID nº 7;

- (iii) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que comprenden un dominio variable de cadena ligera que contiene los residuos del bucle hipervariable de la SEC ID nº 2 o de la SEC ID nº 6; y
  - (iv) un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno que comprenden un dominio variable de cadena pesada que contiene los residuos del bucle hipervariable de la SEC ID nº 4 o de la SEC ID nº 7.
- 5 **8.** El anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno, el uso o el procedimiento de la reivindicación 7 en los que dicho anticuerpo o dicho fragmento del mismo de unión al antígeno comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por:
- (i) los residuos 21-132 de la SEC ID nº 2;
  - (ii) los residuos 21-239 de la SEC ID nº 2;
  - 10 (iii) la SEC ID nº 2;
  - (iv) los residuos 20-139 de la SEC ID nº 4;
  - (v) los residuos 20-469 de la SEC ID nº 4;
  - (vi) la SEC ID nº 4;
  - (vii) los residuos 20-469 de la SEC ID nº 5;
  - 15 (viii) la SEC ID nº 5;
  - (ix) los residuos 21-132 de la SEC ID nº 2 y los residuos 20-139 de la SEC ID nº 4;
  - (x) los residuos 21-239 de la SEC ID nº 2 y los residuos 20-469 de la SEC ID nº 4;
  - (xi) los residuos 21-239 de la SEC ID nº 2 y los residuos 20-469 de la SEC ID nº 5;
  - (xii) la SEC ID nº 2 y la SEC ID nº 4; y
  - 20 (xiii) la SEC ID nº 2 y la SEC ID nº 5.
- 9.** El anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno, el uso o el procedimiento de la reivindicación 7 en los que dicho anticuerpo o dicho fragmento del mismo de unión al antígeno comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por:
- (i) los residuos 21-132 de la SEC ID nº 6;
  - 25 (ii) los residuos 21-239 de la SEC ID nº 6;
  - (iii) la SEC ID nº 6;
  - (iv) los residuos 20-144 de la SEC ID nº 7;
  - (v) los residuos 20-474 de la SEC ID nº 7;
  - (vi) la SEC ID nº 7;
  - 30 (vii) los residuos 20-474 de la SEC ID nº 8;
  - (viii) la SEC ID nº 8;
  - (ix) los residuos 21-132 de la SEC ID nº 6 y los residuos 20-144 de la SEC ID nº 7;
  - (x) los residuos 21-239 de la SEC ID nº 6 y los residuos 20-474 de la SEC ID nº 7;
  - (xi) los residuos 21-239 de la SEC ID nº 6 y los residuos 20-474 de la SEC ID nº 8;
  - 35 (xii) la SEC ID nº 6 y la SEC ID nº 7; y
  - (xiii) la SEC ID nº 6 y la SEC ID nº 8.
- 10.** El anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno, el uso o el procedimiento de cualquier reivindicación precedente en los que dicho anticuerpo es el anticuerpo monoclonal CHIR-5.9, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5542 o el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12, que puede obtenerse de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente nº PTA-5543.
- 40



11. El anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno, el procedimiento o el uso de cualquier reivindicación precedente en los que dicho fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo anti CD40 o dicho anticuerpo anti CD20 están seleccionados del grupo constituido por un fragmento Fab, un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento Fv y un fragmento Fv monocatenario.
- 5 12. El anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno, el uso o el procedimiento de cualquier reivindicación precedente en los que dicho anticuerpo anti CD40 o dicho fragmento del mismo de unión al antígeno se unen al antígeno CD40 humano con una afinidad (K<sub>D</sub>) entre 10<sup>-6</sup> M y 10<sup>-7</sup> M.
- 10 13. El anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno, el uso o el procedimiento de la reivindicación 12 en los que dicho anticuerpo anti CD40 o dicho fragmento del mismo de unión al antígeno se unen con el antígeno CD40 humano con una afinidad (K<sub>D</sub>) entre 10<sup>-8</sup> M y 10<sup>-12</sup> M.
14. El anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno, el uso o el procedimiento de cualquier reivindicación precedente en los que dicho anticuerpo anti CD40 o dicho fragmento del mismo de unión al antígeno son producidos en una línea celular CHO.
- 15 15. El anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno, el procedimiento o el uso de cualquier reivindicación precedente en los que dicha terapia de combinación de anticuerpos proporciona un efecto terapéutico sinérgico o en los que el desarrollo de dicho tumor es inhibido sinérgicamente.
- 20 16. El anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno, el procedimiento o el uso de cualquier reivindicación precedente en los que dicho anticuerpo anti CD20 está seleccionado del grupo constituido por un anticuerpo anti CD20 humano, un anticuerpo anti CD20 murino, un anticuerpo anti CD20 quimérico y un anticuerpo anti CD20 humanizado.
17. El anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno, el procedimiento o el uso de cualquier reivindicación precedente en los que dicho anticuerpo anti CD20 es IDEC-C2B8 o un anticuerpo anti CD20 que tenga las características de unión del IDEC-C2B8.
- 25 18. El anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno, el procedimiento o el uso de cualquier reivindicación precedente en los que el cáncer está seleccionado del grupo constituido por linfoma no hodgkiniano, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, linfoma de células B, linfoma de células B de grado alto, linfoma de células B de grado intermedio, linfoma de células B de grado bajo, leucemia linfoblástica aguda de células B, leucemia mieloblástica, enfermedad de Hodgkin, plasmacitoma, linfoma folicular, linfoma folicular de células pequeñas hendidas, linfoma folicular de células grandes, linfoma folicular mixto de células pequeñas hendidas, linfoma difuso de células pequeñas hendidas, linfoma linfocítico difuso de células pequeñas, leucemia prolinfocítica, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de zona marginal, linfoma del tejido linfoide asociado con mucosas, linfoma monocitoide de células B, linfoma esplénico, leucemia de células peludas, linfoma difuso de células grandes, linfoma mediastínico de células B grandes, granulomatosis linfomatoide, linfomatosis intravascular, linfoma difuso de células mixtas, linfoma difuso de células grandes, linfoma inmunoblástico, linfoma de Burkitt, linfoma relacionado con el sida y linfoma de células del manto.
- 30 35 19. El anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno, el procedimiento o el uso de cualquier reivindicación precedente en los que dicho cáncer es refractario al tratamiento con dicho anticuerpo anti CD20 o dicho fragmento del mismo de unión al antígeno.
- 40 20. El anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno, el procedimiento o el uso de cualquier reivindicación precedente en los que dicho anticuerpo anti CD20 o dicho fragmento del mismo de unión al antígeno y dicho anticuerpo antagonista anti CD40 o dicho fragmento del mismo de unión al antígeno son administrados de forma secuencial.
- 45 21. El anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno, el procedimiento o el uso de cualquier reivindicación precedente en los que dicho anticuerpo anti CD20 o dicho fragmento del mismo de unión al antígeno y dicho anticuerpo antagonista anti CD40 o dicho fragmento del mismo de unión al antígeno son administrados de forma simultánea.

FIGURA 1



## FIGURA 2A

Cadena ligera de CHIR 12.12:

delantera:

MALPAQLLGLLMLWVSGSSG

variable:

DIVMTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLOKPGQSPQVLISLGSNR

ASGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQARQTPFTFGPGTKVDIR

constante:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ

DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

## FIGURA 2B

Cadena pesada de CHIR 12.12:

delantera:

MEFGLSWVFLVAILRGVQC

variable:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYEESNRY

HADSVKGRFTISRDNKITYLQMNLSRTEDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGLTVTV

SS

constante:

ASTKGPSVFPLAPASKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPFAVLQ

SGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCKDKTHTCPPCPAPELL

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE

QYNSYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP

SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV

DKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

región constante alternativa:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPFAVLQ

SGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCKDKTHTCPPCPAPELL

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE

QYNSYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP

SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV

DKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

### FIGURA 3A

Secuencia de ADN de la cadena ligera de CHIR-12.12:

5'atggcgtccctgctcagctcctggggtgctaagtctctgggtctctggatccagtgggatattgtgatgactcagctccac  
tctccctgaccgtaccccctggagagccggcctccatctctcaggtccagtcagagcctcctgtatagtaatgatacaactat  
ttggattggtacctgcagaagccaggcagctctccacagctctgatctcttgggttctaatcggcctccggggtcctgacag  
gtcagtggtgagtgatcaggcacagattttacactgaaaatcagcagagtgaggctgaggatgtggggtttactgcatgc  
aa~ctcgacaaactccattcactttcggcctgggacaaaagtggatatcagacgaactgtggctgacacatctgtctcatctcc  
cgccatctgatgagcagtgaaatctggaactgcctctgtgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagagccaaagtacagt  
ggaaggtgataacgccctccaatcgggtaactcccagagagtgacacagagcaggacgaagacagcacctacagcc  
tcagcagcacctgacgtgagcaaacgagactacgagaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcaggcctgag  
ctcggcctcacaagagctcaacaggggagagtgtag3'

### FIGURA 3B

Secuencia de ADN de la cadena pesada de CHIR-12.12 (incluyendo intrones):

5'atggagttgggctgagctgggtttcttctgtctatttaagaggtgccagtcaggtgcagttggaggagctgggggag  
gctgtgtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcacctcagtagctatggcatgactgggtccg  
ccaggtccaggaagggctggagtggtggcagcttatatcatatgaggaaagtaatagataccatgcagactccgtgaagg  
gccgattcacctcctcagagacaattccaagatcacgctgtatctgcaaatgaacagcctcagaactgaggacacggctgtgta  
ttactgtgcgagagatgggggtatagcagcactgggctgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcaa  
gtaccaagggccatccgtcttcccctggcggcctgtagcaagagcacctctgggggcacagcggcctgggctgctgtgt  
caaggactacttcccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcagggcctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcc  
tacagtctcagactctactcctcagcagcgtgtgaccgtgcccctcagcagcttgggacccagacctacatctgcaacgt  
gaatcacaagcccagcaacccaaggtggacaagagagttggtgagagccagcacagggaggagggtgtctgtgaa  
gccaggtcagcgtcctgcctggacgcatcccggctatgcatcccagtcagggcagcaaggcagggccccgtctgctctt  
caccggaggcctctcccggcactcatgctcagggagaggggtcttctgcttttcccaggctctgggacggcacaggt  
aggtgcccttaaccagccctgcacacaaagggcaggtgctgggctcagacctccaagagccatatccgggagggacc  
tgcccctgacctaaagccaccccaagggcaaaactctcactcctcagctcggacaccttctctctcccagattccagtaact  
ccaatcttctctcagagcccaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccaggtaagccagcccaggcctcgc  
cctcagctcaagcgggacaggtccctagagtagcctgcatccagggacagggcccagccgggtgctgacagctccacct  
ccatcttctcctcagcacctgaactcctgggggaccgtcagctcttctcttcccccaaaaccaaggacacctcatgatctcc  
cggaccctgaggtcacatgctgtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcg  
tggaggtgcataatccaagacaaagccggggagagcagtaaacagcagctaccgtgtgtcagcgtcctcaccgtct  
gcaccaggtgctgaatggcaaggagtacaaggtccaaggtccaacaaagccctcccagccccatcagaaaaccatc  
tccaaagccaaaggtgggaccctgggggtgcagggccacatggacagagccggctcggcccacctctgcccagagat  
gaccgtgtaccaacctctgtccctacagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggagagatg  
accaagaaccaggtcagcctgacctgctgtaaaagcttctatcccagcagatcggcgtgaggtgggagagcaatgggc  
agccggagaacactacaagaccacgctcccgtgctggactccgacggctccttctctctatagcaagctcaccgtggaca  
agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcctgatgcatgaggtctgcacaaccactacacgagaagagcctc  
tcctgtctccgggtaaatga3'

## FIGURA 4A

Cadena ligera de CHIR-5.9:

delantera:

MALLAQLLGLLMLWVPGSSG

variable:

AIVMTQPPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWLQQRPGQPPRLLIYKFFRR

LSGVPDFRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVIYCMQVTQFPHTFGQGRLEIK

constante:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ

DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

## FIGURA 4B

Cadena ligera de CHIR-5.9:

delantera:

MGSTAILALLLAVLQGVCA

variable:

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMMGIIPGDSDR

YSPSFQGGVTTISADKSIKSTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGTAAGRDYYYYYGMVDVWGQG

TTVTVSS

constante:

ASTKGPSVFPLAPASKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQS

SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHCTCPPEPELL

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE

QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP

SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE~KTPPVLDSDGSFFLYSKLTV

DKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

región constante alternativa:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQS

SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHCTCPPEPELL

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE

QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP

SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV

DKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**FIGURA 5A**

Secuencia de codificación para la isoforma corta del CD40 humano:

```

1 atggttcgtc tgcctctgca gtgcgtctc tggggctgct tgctgaccgc tgtccatcca
61 gaaccaccca ctgcatgcag agaaaaacag tacctaataa acagtcagtg ctgttctttg
121 tgccagccag gacagaaact ggtgagtgc tgacacagag tctactgaaac ggaatgcctt
181 ccttgccggtg aaagcgaatt cctagacacc tggaacagag agacacactg ccaccagcac
241 aaatactgcy accccaacct agggcttcgg gtccagcaga agggcacctc agaaacagac
301 accatctgca cctgtgaaga aggctggcac tgtacgagtg aggcctgtga gagctgtgtc
361 ctgcaccgct catgctcgcc cggctttggg gtcaagcaga ttgctacagg ggtttctgat
421 accatctgcy agccctgccc agtcggcttc tctccaatg tgatcatctgc ttcgaaaaa
481 tgtcaccctt ggacaaggtc cccaggatcg gctgagagcc ctggtggtga tccccatcat
541 cttcgggatc ctgtttgcca tcctcttggt gctggtcttt atcaaaaagg tggccaagaa
601 gccaaccaat aa

```

**FIGURA 5B**

Isoforma corta codificada del CD40 humano:

```

1 mvrplqcvl wgclltavhp epptacrekq ylinsqccsl cpggqklvsd cteftetecl
61 pcgesefldt wnrethchqh kydpnlglr vqqkgtsetd tictceegwh ctseacescv
121 lhrscspgfg vkqiatgvsd ticepcpvgf fsnvssafek chpwtrspgs aespqgdphh
181 lrdpvchplg aglyqkqqe anq

```

## FIGURA 5C

Secuencia de codificación para la isoforma larga del CD40 humano:

```

1 atggttcgtc tgcctctgca gtgcgtcctc tggggctgct tgctgaccgc tgtccatcca
61 gaaccaccca ctgcatgcag agaaaaacag tacctaataa acagtcagtg ctgttctttg
121 tgccagccag gacagaaact ggtgagtgac tgcacagagt tcaactgaaac ggaatgcctt
181 ccttgccggtg aaagcgaatt cctagacacc tggaacagag agacacactg ccaccagcac
241 aaatactgcg accccaacct agggcttcgg gtccagcaga agggcacctc agaaacagac
301 accatctgca cctgtgaaga aggctggcac tgtacgagtg aggcctgtga gagctgtgct
361 ctgcaccgct catgctcgcc cggctttggg gtcaagcaga ttgct~cagg ggtttctgat
421 accatctgcy agccctgccc agtcggcttc ttctccaatg tgatcatctgc tttcgaaaaa
481 tgtcacccctt ggacaagctg tgagacaaa gacctggttg tgcaacaggc aggcacaaaac
541 aagactgatg ttgtctgtgg tccccaggat cggctgagag ccttgggtgt gatccccatc
601 atcttcggga tcctgtttgc catcctcttg gtgctggtct ttatcaaaaa ggtggccaag
661 aagccaacca ataaggcccc ccacccaag caggaaacccc aggagatcaa ttttccgac
721 gatcttcttg gctccaacac tgctgctcca gtgcaggaga ctttacatgg atgccaaccg
781 gtcacccagg aggatggcaa agagagtgc atctcagtg aggagagaca gtga

```

## FIGURA 5D

Isoforma larga codificada del CD40 humano:

```

1 mvrplqcvl wgclltavhp epptacrekq ylinsqccsl cpggqklvsd cteftetecl
61 pcgesefldt wnrethchqh kyedpnlglr vqqkgtsetd tictceegwh ctseacescv
121 lhrscspgfg vkqiatgvsd ticepcpvgf fsnvssafek chpwtscetk dlvvqqagtn
181 ktdvvcgpgd rlralvvipi ifgilfaill vlvfikkvak kptnkaphpk qepqeinfpd
241 dlpgsntaap vqetlhgcqp vtqedgkesr isvqerq

```

**FIGURA 6**